

Aus dem Zentrum für Translationale Knochen-, Gelenk-, und Weichgewebeforschung
Leiter: Herr Prof. Dr. Michael Gelinsky

Entwicklung und Charakterisierung von Scaffolds auf Basis von mineralisiertem
Kollagen zur gezielten Wirkstofffreisetzung für die Knochengewebe-Regeneration

D i s s e r t a t i o n s s c h r i f t

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus
der Technischen Universität Dresden

M.Sc. Sven Knaack
aus Dresden

Dresden 2015

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Michael Gelinsky

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Henning Morawietz

Tag der mündlichen Prüfung: 04.11.2015

Tag der Verteidigung: 04.11.2015

Vorsitzender der Promotionskommission: Herr Prof. Dr. Albrecht May

für meine Familie

“Willst du wissen, wer du warst, so schau, wer du bist.
Willst du wissen, wer du sein wirst, so schau, was du tust!”
(Siddharta Gautama)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis.....	XI
1 Grundlagen.....	- 13 -
1.1 Knochen.....	- 13 -
1.1.1 Morphologie, Zusammensetzung und Funktion.....	- 13 -
1.1.2 Knochenmatrix.....	- 14 -
1.1.3 Zellen des Knochens	- 16 -
1.2 Knochenregeneration.....	- 19 -
1.3 Tissue Engineering des Knochens	- 22 -
1.3.1 Der klassische Tissue Engineering-Ansatz	- 22 -
1.3.2 Angiogenese und angiogene Wachstumsfaktoren	- 27 -
1.3.3 VEGF als Schlüsselfaktor der Angiogenese.....	- 28 -
1.3.4 <i>In situ</i> -Tissue Engineering	- 30 -
1.3.5 Drug Delivery von Faktoren und Chemokinen.....	- 31 -
1.4 Trägermaterial – Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen.....	- 36 -
2 Zielstellung der Arbeit.....	- 39 -
3 Material und Methoden.....	- 40 -
3.1 Feinchemikalien, Medien, Lösungen	- 40 -
3.2 3D-Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen	- 41 -
3.2.1 Aufbereitung des Kollagens.....	- 43 -
3.2.2 Synchrone Fibrillenbildung und Mineralisierung	- 43 -
3.2.3 3D-Scaffold-Herstellung.....	- 43 -
3.3 Heparin-Modifizierung der Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen.....	- 44 -
3.3.1 „insitu“-Modifizierung	- 44 -
3.3.2 „post“-Modifizierung	- 44 -
3.4 Funktionalisierung mit Hydrogelen zur Integration eines zentralen Wirkstoffdepots.....	- 45 -

3.4.1	Komponenten der Wirkstoff-Depots.....	- 45 -
3.4.2	Injizierung der Wirkstoffdepots in Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen.....	- 46 -
3.5	Materialcharakterisierung.....	- 47 -
3.5.1	Nachweis des gebundenen bzw. integrierten Heparins im Scaffold.....	- 47 -
3.5.2	Nachweis der injizierten Depot-Komponenten in den Scaffolds	- 48 -
3.5.3	Rasterelektronenmikroskopie zur Bestimmung der Porenmorphologie.....	- 49 -
3.5.4	Transmissionselektronenmikroskopie.....	- 49 -
3.5.5	Bestimmung des Mineralgehaltes (Glühverlust)	- 50 -
3.5.6	Bestimmung von mechanischen Kenngrößen	- 50 -
3.6	Beladung der Scaffolds mit dem Wirkstoff VEGF	- 51 -
3.6.1	Homogene Beladung der gesamten Scaffolds	- 51 -
3.6.2	Beladung der Scaffolds mit einem zentralen VEGF-haltigen Depot	- 52 -
3.6.3	Freisetzung aus VEGF-beladenen Scaffolds.....	- 52 -
3.6.4	Nachweis eines Wirkstoffgradienten innerhalb von Scaffolds mit einem zentralen VEGF-haltigen Depot	- 53 -
3.7	Bestimmung der VEGF-Konzentration.....	- 53 -
3.8	Zellen	- 55 -
3.8.1	Osteogene Differenzierung von hMSC	- 57 -
3.8.2	Proliferationsexperimente mit HDMEC	- 57 -
3.8.3	Migrationsexperimente mit HDMEC	- 59 -
3.9	Biochemische Analysemethoden.....	- 62 -
3.9.1	Bestimmung des DNA-Gehaltes.....	- 63 -
3.9.2	Bestimmung der LDH-Aktivität.....	- 63 -
3.9.3	Bestimmung der spezifischen ALP-Aktivität	- 64 -
3.9.4	MTT-Färbung vitaler Zellen	- 64 -
3.9.5	Rasterelektronenmikroskopie zur Bestimmung der Zellverteilung im Scaffold ..	- 64 -
3.10	Statistische Methoden	- 65 -
4	Ergebnisse.....	- 66 -
4.1	Heparin-Modifizierung von Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen	- 66 -
4.1.1	Heparinbindung	- 66 -

4.1.2	Struktur und Zusammensetzung.....	- 73 -
4.1.3	Bestimmung der mechanischen Kenngrößen.....	- 76 -
4.1.4	Zellbiologische Charakterisierung der Heparin-modifizierten Scaffolds	- 77 -
4.1.5	Funktionalisierung mit VEGF	- 82 -
4.2	Entwicklung von einem zentralen Depot in Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen-	- 93 -
4.2.1	Etablierung eines zentralen Wirkstoffdepots	- 93 -
4.2.2	Bildung eines Wirkstoffgradienten aus zentralen Depots unterschiedlicher Zusammensetzung	- 98 -
4.2.3	VEGF-Freisetzung aus den Wirkstoffdepots	- 100 -
4.2.4	Bestimmung der biologischen Aktivität des aus den injizierten Depots freigesetzten VEGF	- 105 -
4.2.5	Migration von Endothelzellen durch Chemotaxis in Scaffolds mit injiziertem Wirkstoffdepot.....	- 108 -
5	Diskussion	- 112 -
5.1	Heparin-Modifizierung.....	- 113 -
5.1.1	Integration von Heparin in Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen.....	- 113 -
5.1.2	Einfluss von Heparin auf die Scaffold Eigenschaften.....	- 116 -
5.1.3	Einfluss auf die Adhäsion, Proliferation und Differenzierung von hMSC	- 118 -
5.1.4	VEGF-Freisetzung und biologische Aktivität	- 120 -
5.2	VEGF-haltige Depots in Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen	- 131 -
5.2.1	Nachweis der Depot-Komponenten.....	- 131 -
5.2.2	Optischer Nachweis zur Bildung eines Wirkstoffgradienten	- 132 -
5.2.3	VEGF-Freisetzung	- 133 -
5.2.4	Biologische Aktivität des freigesetzten VEGF.....	- 139 -
5.2.5	Migration in Richtung eines VEGF-haltigen Depots	- 141 -
	Zusammenfassung.....	- 143 -
	Summary	- 146 -
	Literaturverzeichnis	- 149 -
	Anhang	- 173 -
	Danksagung	- 184 -

Eidesstattliche Erklärung.....	- 185 -
Einhaltung der aktuellen gesetzlichen Vorgaben im Rahmen meiner Dissertation.....	- 186 -
Publikationsverzeichnis	- 187 -

Abkürzungsverzeichnis

AAP	<i>ascorbic acid 2-phosphate</i>
AK	Antikörper
Alg	Alginat
ALP	alkalische Phosphatase
α -MEM	<i>minimum essential medium, α-modification</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BMP	<i>bone morphogenic protein</i>
BSA	bovines Serumalbumin
cLSM	konfokales Laser-Rastermikroskop
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
Dex	Dexamethason
DMMB	1,9-Dimethylmethylenblau
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N</i> -ethylcarbodiimid Hydrochlorid
EDTA	<i>ethylen-diamin-tetraacetat</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FS	Freisetzungsmedium
G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
Hep	Heparin
HAP	Hydroxylapatit
HDMEC	<i>human dermal microvascular endothelial cells</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF	<i>hypoxia inducible factor</i>
hMSC	<i>human mesenchymal stem cell</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSC	<i>hematopoietic stem cell</i>
HYA	Hyaluronsäure
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IgG	Immunoglobulin G
LDH	Lactatdehydrogenase

MC	Methylcellulose
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
Min. Koll.	Mineralisiertes Kollagen
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid nach Addition eines Hydridions
β-NFG	β-nerve growth factor
NHS	N-Hydroxysuccinimid
+OS	osteogen induzierte Zellen
-OS	nicht osteogen induzierte Zellen
OPG	<i>osteoprotegerin</i>
PAb	<i>purified antibody</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCL	Polycaprolacton
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PEG	Polyethylenglycol
PEI	Polyethylenimin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PGA	Polyglycolsäure
PIGF	<i>placental growth factor</i>
PLA	<i>poly lactic acid</i>
PLGA	<i>poly lactic-co-glycolic acid</i>
pNp	para-Nitrophenol
pNpp	para-Nitrophenylphosphat
PTH	Parathormon
RANK/RANKL	<i>receptor activator for nuclear factor κ B/ligand</i>
REM	Rasterelektronenmikroskopie
rhVEGF-A165	<i>recombinant human vascular endothelial growth factor A-165</i>
RT	Raumtemperatur
β-GP	β-Glycerophosphat
SBF	<i>simulated body fluid</i>
SDF	<i>stromal derived factor</i>
Stabw	Standardabweichung
T/E	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan/EDTA
β-TCP	β-Tricalciumphosphat

TCPS	<i>tissue-culture polystyrene</i>
TE	<i>Tissue Engineering</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor - β</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des Knochengewebes (verändert nach Buck und Dumanian, 2012) ..	14 -
Abbildung 2: Schematische Abbildung der Assemblierung von Kollagenfibrillen und Mineralkristallen im Knochen (verändert nach Rho et al., 1998)	15 -
Abbildung 3: Schematische Abbildung der am Knochenmetabolismus beteiligten Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten (verändert nach Hall und Guyton, 2011)	17 -
Abbildung 4: Phasen der Frakturheilung von Knochengewebe (verändert nach Carano und Filvaroff, 2003)	20 -
Abbildung 5: Schema des Knochen-Tissue Engineering (verändert nach Stevens, 2005) ..	22 -
Abbildung 6: Prozess der Angiogenese (verändert nach Lee et al., 2007)	28 -
Abbildung 7: Chemische Struktur von Heparin (verändert nach Capila und Linhardt, 2002)	34 -
Abbildung 8: Synchrone Fibrillen-Reassemblierung und -Mineralisierung mit HAP	42 -
Abbildung 9: Schematische Abbildung der Funktionalisierung von mineralisierten Kollagenscaffolds mit einem zentralen Hydrogelwirkstoffdepot und Darstellung der modifizierten Multipipette zur Injizierung eines Wirkstoffdepots	46 -
Abbildung 10: Homogene Beladung von 3D-Scaffolds mit VEGF	52 -
Abbildung 11: VEGF-Freisetzung aus den verschiedenen beladenen Scaffolds und anschließende Analyse	53 -
Abbildung 12: Schematische Darstellung eines Proliferationsexperimentes zur Testung der biologischen Aktivität des aus den Scaffolds freigesetzten VEGF	58 -
Abbildung 13: Schematischer Ablauf eines Zellmigrationsexperimentes	60 -
Abbildung 14: Menge an gebundenem Heparin an „post“-modifizierten Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen	67 -
Abbildung 15: Menge an ungebundenem Heparin in der Inkubationslösung von „post“-modifizierten Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen	67 -
Abbildung 16: Heparingehalt der „insitu“- und „post“-modifizierten Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen ..	68 -
Abbildung 17: Heparingehalt der „insitu“- und „post“-modifizierten Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen nach der Herstellung (A) und nach 28 Tagen Inkubation unter Zellkulturbedingungen (B) (n=5, Mittelwert \pm Stabw).	69 -
Abbildung 18: Differenz der gebundenen Heparinmenge von Heparin-modifizierten Scaffolds nach 28-tägiger Inkubation zur gebundenen Heparinmenge an frisch hergestellten Scaffolds	70 -

Abbildung 19: Nachweis des an Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen gebundenen Heparins mittels DMMB-Färbung	- 72 -
Abbildung 20: Heparin-freie und Heparin-modifizierte Scaffolds nach 10 min Inkubation in einer DMMB-Lösung.	- 73 -
Abbildung 21: REM-Aufnahmen der Oberfläche von mineralisierten Kollagenscaffolds modifiziert mit Heparin.	- 74 -
Abbildung 22: TEM-Aufnahmen von nicht kontrastierten Ultradünnschnitten von einem Heparin-freien Scaffold (0) und einer "insitu"-modifizierten Variante (I-150) mit Hep. ...	- 75 -
Abbildung 23: Elastizitätsmodul von Heparin-freien und modifizierten Scaffolds (n=10, Mittelwert \pm Stabw, *p<0,05).....	- 77 -
Abbildung 24: Druckspannung von Heparin-freien und modifizierten Scaffolds bei einer Kompression von 20% (n=10, Mittelwert \pm Stabw, *p<0,05).	- 77 -
Abbildung 25: MTT-Färbung von zellbesiedelten Scaffolds nach einer Kultivierungsdauer von 1, 14 und 28 Tagen.	- 78 -
Abbildung 26: Verteilung von hMSC im Querschnitt von Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen am Tag 1, 14 und 28 untersucht mittels REM-Aufnahmen.	- 79 -
Abbildung 27: Zellproliferation auf Heparin-freien und Heparin-modifizierten Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen über einen Zeitraum von 28 Tagen (n=3, Mittelwert \pm Stabw, *p<0,05).	- 80 -
Abbildung 28: Spezifische ALP-Aktivität von hMSC, kultiviert in Heparin-freien und Heparin-modifizierten Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen, zu den Zeitpunkten Tag 1, 7, 14, 21 und 28 (n=3, Mittelwert \pm Stabw, *p<0,05).	- 82 -
Abbildung 29: Quantifizierung des ungebundenen VEGF mittels ELISA. Scaffolds wurden mit 200 ng VEGF beladen und nach 12 h Inkubation gespült (n=4, Mittelwert \pm Stabw, *p < 0,05).	- 83 -
Abbildung 30: VEGF-Freisetzung von Heparin-freien und Heparin-modifizierten Scaffolds über 7 Tage.	- 85 -
Abbildung 31: VEGF-Freisetzung aus Heparin-freien und Heparin-modifizierten Scaffolds über 28 Tage.	- 87 -
Abbildung 32: VEGF-konzentrationsabhängige Proliferation von HDMEC.	- 88 -
Abbildung 33: Biologische Aktivität des von Scaffolds freigesetzten VEGF zu den Zeitpunkten 24 h und 7 d.	- 89 -
Abbildung 34: Schematische Darstellung zur Bestimmung der biologischen Aktivität von freigesetztem VEGF aus Heparin-freien und Heparin-modifizierten Varianten und des Einflusses der VEGF-Menge sowie der Heparin-Modifikation auf die Zunahme der Zellzahl durch Vergleich mit einer Kalibriergeraden mit definierten VEGF-Konzentrationen im Bereich von 0-7 ng/ml	- 90 -

Abbildung 35: Biologische Aktivität des freigesetzten VEGF zum Zeitpunkt Tag 7 im Vergleich zu „frischem“ VEGF (Kalibriergeraden (Kalibr.G)).	- 92 -
Abbildung 36: Schematische Darstellung der Freisetzung des Modellfaktors VEGF aus einem zentralen Wirkstoffdepot <i>in vivo</i> , welches <i>in vitro</i> in ein Scaffold aus mineralisiertem Kollagen injiziert wurde.	- 93 -
Abbildung 37: Gefärbtes Alginatgel, injiziert in Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen.	- 94 -
Abbildung 38: Färbung der verschiedenen Depotkomponenten mit DMMB und Alcianblau. Zeitpunkte nach 10 min, 1, 3 und 28 d.	- 97 -
Abbildung 39: Ausbildung eines VEGF-Gradienten innerhalb von Scaffolds, in welche verschiedene Depotvarianten injiziert wurden.	- 100 -
Abbildung 40: VEGF-Freisetzung aus Scaffolds mit zentralem Wirkstoffdepot. Einsatz von 400 ng VEGF pro Scaffold, welches zusammen mit einer Lösung bzw. Hydrogelkomponenten injiziert wurde.	- 103 -
Abbildung 41: Einfluss von (potentiell) freigesetzten Depotkomponenten auf die Proliferation von Endothelzellen, untersucht anhand der Differenz der Zellzahl von verschiedenen Depotvarianten im Vergleich zur Kontrollvariante (auf 100% gesetzt) (n=3, Mittelwert \pm Stabw, *p < 0,05).	- 105 -
Abbildung 42: Biologische Aktivität des freigesetzten VEGF aus Scaffolds mit einem injizierten Depot zu den Zeitpunkten 7, 14 und 28 Tagen.	- 107 -
Abbildung 43: Testung einer gerichteten Migration von Endothelzellen im Scaffold aus mineralisiertem Kollagen unter Verwendung des Wachstumsfaktors VEGF	- 108 -
Abbildung 44: Zellverteilung von HDMEC in Scaffolds mit injiziertem Depot nach dreitägiger Kultivierung im Bereich von 0 bis 1000 μ m Tiefe (0 μ m = Besiedlungsoberfläche). Zur Analyse der Migration wurden	- 110 -
Abbildung 45: Zellverteilung im Scaffold mit und ohne VEGF anhand Fluoreszenz-mikroskopischer Aufnahmen.	- 111 -
Abbildung 46: VEGF-Freisetzung von Heparin-freien und Heparin-modifizierten Scaffolds über 7 Tage (Wiederholungsversuch 1).	- 176 -
Abbildung 47: VEGF-Freisetzung von Heparin-freien und Heparin-modifizierten Scaffolds über 7 Tage (Wiederholungsversuch 2).	- 178 -
Abbildung 48: Biologische Aktivität des von Scaffolds freigesetzten VEGF zu den Zeitpunkten 2 h, 24 h, 48 h und 7 d (entspricht (Wiederholungsversuch 1).	- 179 -
Abbildung 49: Biologische Aktivität des von Scaffolds freigesetzten VEGF zu den Zeitpunkten 2 h, 24 h, 48 h und 7 d (entspricht Wiederholungsversuch 2).	- 180 -
Abbildung 50: VEGF-Freisetzung aus Scaffolds beladen mit einem VEGF-haltigen Depot.	- 181 -
Abbildung 51: VEGF-Freisetzung aus Scaffolds beladen mit einem VEGF-haltigen Depot.	- 182 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Materialklassen für das Knochen-Tissue Engineering und ihre Vor- und Nachteile.....	- 24 -
Tabelle 2: Verschiedene Biopolymere zur Anwendung als Hydrogel in Drug Delivery-Systemen.	- 35 -
Tabelle 3: Feinchemikalien und Materialien	- 40 -
Tabelle 4: Nachweisreagenzien, Enzyme und Wachstumsfaktoren	- 40 -
Tabelle 5: Zellkulturmedien und Zusätze	- 41 -
Tabelle 6: Kit-Systeme	- 41 -
Tabelle 7: Lösungen/Puffer und Enzyme für die Kollagenherstellung.....	- 41 -
Tabelle 8: Probenbezeichnung der Heparin-modifizierten Scaffolds	- 45 -
Tabelle 9: Zusammensetzung der Wirkstoffdepots	- 45 -
Tabelle 10: Lösungen zum Nachweis von Heparin	- 47 -
Tabelle 11: Färbelösungen zum Detektieren der Hydrogelkomponenten	- 48 -
Tabelle 12: Zusammensetzung der verwendeten SBF	- 51 -
Tabelle 13: Lösungen bzw. Medien zur Beladung mit VEGF und Untersuchung der Freisetzung	- 51 -
Tabelle 14: Lösungen und Antikörper für die ELISAs	- 54 -
Tabelle 15: Arbeitsvorschrift zur Durchführung des ELISA	- 54 -
Tabelle 16: Zellkulturmedien und Mediumsbestandteile für hMSC	- 56 -
Tabelle 17: Zellkulturmedien und Mediumsbestandteile für HDMEC	- 57 -
Tabelle 18: Medien für die Proliferationsexperimente	- 59 -
Tabelle 19: Pipettierschema zur Kultivierung mit VEGF	- 59 -
Tabelle 20: Farbstoffe, Medien und Materialien für die Probenpräparation	- 61 -
Tabelle 21: Lösungen und Puffer für die biochemischen Analysemethoden	- 62 -
Tabelle 22: Anorganische und organische Phasenanteile von Heparin-freien und modifiz. Scaffolds (n=4).....	- 76 -
Tabelle 23: Einteilung der injizierten Wirkstoffkomponenten in Gruppen	- 94 -
Tabelle 24: Übersicht der verwendeten Färbelösungen zum Nachweis der Depotkomponenten..	- 95 -
Tabelle 25: Zusammenfassung der Ergebnisse zum Nachweis der einzelnen Komponenten, injiziert in Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen, zu verschiedenen Zeitpunkten	- 98 -
Tabelle 26: Übersicht zum VEGF-Freisetzungsverhalten aus Depots und Hydrogeldepots, injiziert in Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen	- 104 -

Tabelle 27: Übersicht der biolog. Aktivität des zu den Zeitpunkten Tag 7, 14 und 28 aus injizierten Depots in Scaffolds freigesetzten VEGF	- 107 -
Tabelle 28: Übersicht zum migrationsfördernden Effekt von VEGF, injiziert als Lösung oder mit Hydrogeldepot in Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen, auf Endothelzellen	- 110 -
Tabelle 29: VEGF-Menge der täglichen und kumulativen Freisetzung aus den unten stehenden Scaffoldvarianten über 7 Tage.....	- 173 -
Tabelle 30: VEGF-Menge der absoluten und kumulativen Freisetzung aus den unten stehenden Scaffoldvarianten zu ausgewählten Zeitpunkten	- 174 -
Tabelle 31: VEGF-Menge der absoluten und kumulativen Freisetzung aus Kollagenscaffolds beladen mit einer VEGF-Lösung oder mit einem VEGF-haltigen Hydrogeldepot zu ausgewählten Zeitpunkten.....	- 175 -
Tabelle 32: VEGF-Menge der täglichen und kumulativen Freisetzung aus den unten stehenden Scaffoldvarianten über 7 Tage (Wiederholungsversuch 1).....	- 177 -
Tabelle 33: VEGF-Menge der täglichen und kumulativen Freisetzung aus den unten stehenden Scaffoldvarianten über 7 Tage (Wiederholungsversuch 2).....	- 178 -
Tabelle 34: VEGF-Menge der absoluten und kumulativen Freisetzung aus Kollagenscaffolds beladen mit einer VEGF-Lsg oder mit einem Hydrogeldepot zu ausgewählten Zeitpunkten (Wiederholungsversuch 1)	- 181 -
Tabelle 35: VEGF-Menge der absoluten und kumulativen Freisetzung aus Kollagenscaffolds beladen mit einer VEGF-Lsg oder mit einem Hydrogeldepot zu ausgewählten Zeitpunkten (Wiederholungsversuch 2)	- 183 -

1 Grundlagen

1.1 Knochen

1.1.1 Morphologie, Zusammensetzung und Funktion

Das Skelett ist eine höchst spezialisierte Form des Bindegewebes und stellt ein natürliches inneres Stützsystem in allen höheren Vertebraten dar (Meyer und Wiesmann, 2006). Das menschliche Skelett besteht aus 213 Knochen (exklusive der Sesambeine (Knochen, welche nur mit Sehnen verbunden oder in Muskeln eingebettet sind, lat. *Ossa Sesamoidea*)) (Clarke, 2008). Wird die Morphologie des Knochens betrachtet, so kann dieser in zwei Formen unterteilt werden: den kortikalen oder kompakten Knochen und den spongiösen oder trabekulären Knochen (Abbildung 1) (Rho et al., 1998; Meyer und Wiesmann, 2006; Safadi et al., 2009; Buck und Dumanian, 2012). Insgesamt bestehen 80% des Gewichtes eines erwachsenen Skelettes aus kortikalem Knochen mit einer Porosität von 5 bis 10%, während der spongiöse Knochen 20% des Gewichtes ausmacht und eine Porosität von 50 bis 90% besitzt und damit eine signifikant größere Oberfläche pro Volumeneinheit aufweist (Safadi et al., 2009; Buck und Dumanian, 2012).

Der kortikale Knochen weist einen hoch-organisierten Aufbau mit dicht gepackten Bündeln aus mineralisierten Kollagenfibrillen auf, was dem Knochen seine Festigkeit gibt. Kortikale Osteone, auch als Haverssches System bezeichnet (Clarke, 2008), bilden das hauptsächliche strukturelle Element des kortikalen Knochens und bestehen aus 5-15 Zylindern, welche parallel der Längsachse des Knochens verlaufen und konzentrisch einen zentralen Haversschen Kanal umgeben (Buck und Dumanian, 2012). Zwischen den Lamellen der Osteone befinden sich die Osteozyten, eingeschlossen von mineralisierter Matrix (Meyer und Wiesmann, 2006; Beniash, 2011). Der Haverssche Kanal beinhaltet neben Venen, Arterien oder Lymphgefäßen auch lockeres Bindegewebe mit Osteoprogenitorzellen. Volkmann's Kanäle sind vaskuläre Kanäle, welche sowohl Haverssche Kanäle miteinander als auch das Haverssche System mit dem Periosteum verbinden (Buck und Dumanian, 2012). Die äußere Oberfläche des kortikalen Knochens wird vom Periosteum umgeben, einem fibrösen Bindegewebe, welches Blutgefäße, Nerven, Osteoblasten und Osteoklasten enthält (Clarke, 2008; Safadi et al., 2009).

Die poröse Struktur des spongiösen Knochens besteht aus Trabekeln, die durch Markhöhlen, in denen sich das Knochenmark befindet, voneinander separiert sind. Die Trabekel sind mit Osteoblasten und weiteren Knochenzellen bedeckt. Die Struktur ist locker makroporös und darauf optimiert, Kräfte (Lasten) im Knochen zu übertragen. Dabei kommt es zu einem dynamischen Prozess zwischen Lastwahrnehmung der Zellen und ihrer darauffolgenden Reaktion (Meyer und Wiesmann, 2006). Spongiöser Knochen hat eine höhere metabolische Aktivität, die Fähigkeit zur Umformung und eine schnellere Reaktion auf mechanische

Stimulation als kortikaler Knochen, da die primären Knochenzellen auf der Oberfläche liegen und sich damit näher an zirkulierenden Wachstumsfaktoren und Zytokinen befinden (Safadi et al., 2009). Die primäre Funktion des spongiösen Knochens ist die Aufnahme von Energie durch die Fähigkeit zur Deformation und damit Absorption von Lasten, während der kortikale Knochen ein Maximum an Widerstand gegen Verdrehung und Biegung bietet und dem Knochen seine Druckfestigkeit gibt. Des Weiteren schützt das Knochengewebe innere Organe, dient als Stammzell-Nische, ist ein Reservoir für Mineralien und Wachstumsfaktoren, reguliert die Mineral-Homöostase und ist für die Blutbildung wichtig (Weiner und Wagner, 1998; Kneser et al., 2006; Clarke, 2008).

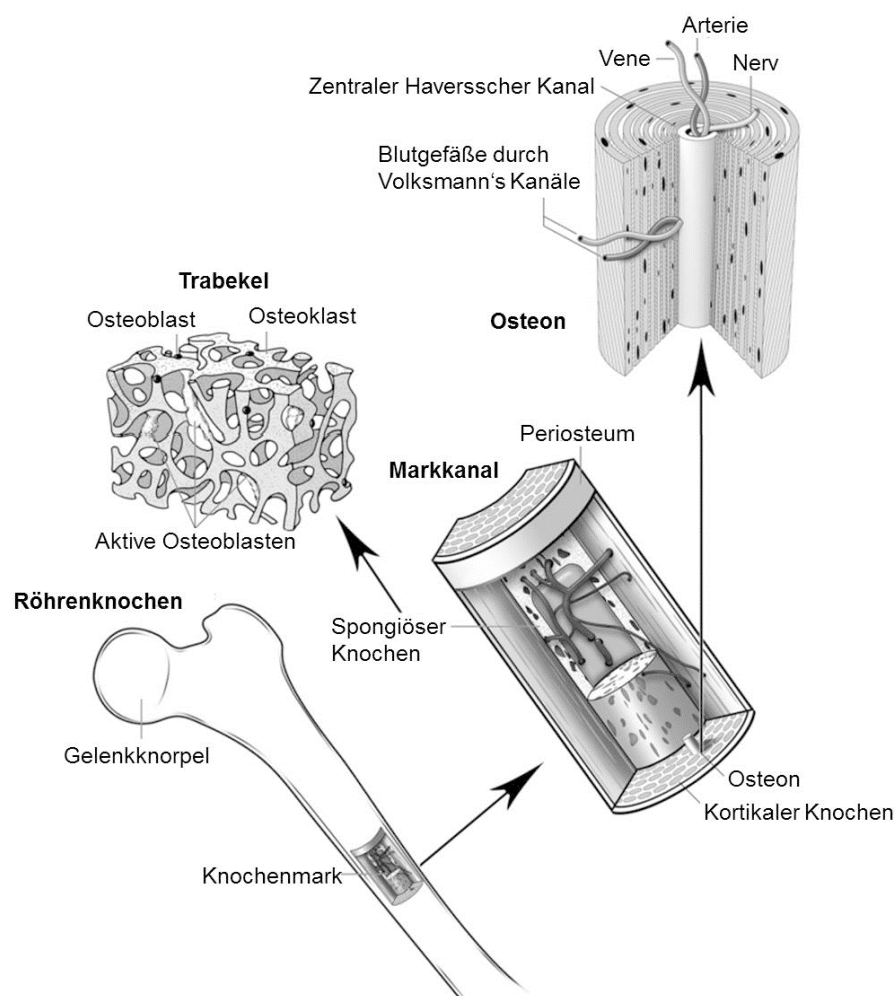


Abbildung 1: Aufbau des Knochengewebes (verändert nach Buck und Dumanian, 2012)

1.1.2 Knochenmatrix

Knochen ist das größte mineralisierte Gewebe des menschlichen Körpers, die extrazelluläre Knochenmatrix (ein Komposit) besteht aus drei Grundkomponenten: einem anorganischen Anteil (zwischen ~60 bis 70%), einem organischen Anteil (~20 – 30%) und Wasser (~10%) (Beniash, 2011; Buck und Dumanian, 2012). Der anorganische Teil besteht hauptsächlich

aus Calcium- und Phosphat-Ionen in Form von nanokristallinem Hydroxylapatit (HAP). Der durch Osteoblasten gebildete organische Bestandteil besteht zu ~90-95% aus Kollagen Typ I; zahlreiche Proteoglykane (z.B. Dekorin, Fibromodulin) und Glykoproteine (z.B. Osteonectin, Osteopontin) machen den restlichen Teil aus (Hadjidakis und Androulakis, 2006; Meyer und Wiesmann, 2006; Beniash, 2011).

Mineralisierte Kollagenfibrillen sind die Basis der Knochenmatrix und bestimmen die mechanischen Eigenschaften im Nanometerbereich. Der Grundbaustein für die Bildung von Mikro-fibrillen und Fibrillen ist molekulares Kollagen, welches sich zu einer linksgängigen α -Helix aus 3 Polypeptidketten anordnet und auch als Tropokollagen bezeichnet wird. Anhand der Zusammenlagerung weisen die Mikro-fibrillen eine spezifische tertiäre Struktur auf, wobei die Fibrillen eine 67 nm Periodizität aufweisen und 40 nm Hohlräume zwischen den Enden der Moleküle haben. In diesen Zwischenräumen findet die Kristallisation des HAP statt (Abbildung 2) (Rho et al., 1998; Weiner und Wagner, 1998; Gelse, 2003; Euehler, 2006; Nassif et al., 2010).

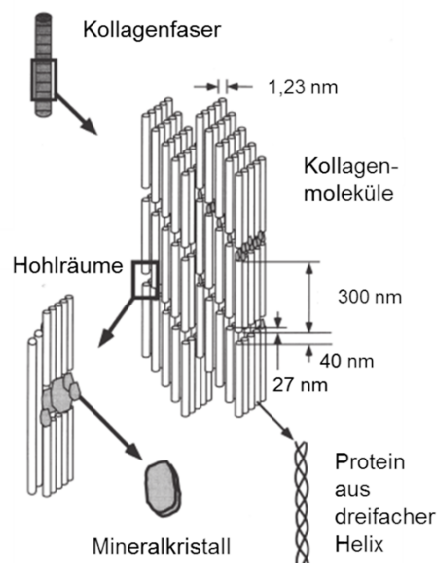


Abbildung 2: Schematische Abbildung der Assemblierung von Kollagenfibrillen und Mineralkristallen im Knochen (verändert nach Rho et al., 1998)

Der Hauptbestandteil der organischen Matrix des Knochens ist das Faserprotein Kollagen Typ I. Zusätzlich enthält die Matrix Calcium-bindende Proteine (*bone sialoprotein*, Osteopontin und Osteonectin), Mineralisationsproteine (Osteocalcin), Adhäsionsproteine (Osteopontin, Fibronectin und Thrombospondin), Zytokine und Wachstumsfaktoren (Safadi et al., 2009), welche bei der Knochenbildung (Osteogenese), Mineralisation und dem Umbau des Knochens beteiligt sind. Die organische Matrix gibt dem Knochen seine Form, bietet Elastizität und Zugfestigkeit (Meyer und Wiesmann, 2006; Buck und Dumanian, 2012). Auch die

Komponenten Lipide und Wasser sind für die mechanische Funktion des Knochens von Bedeutung, so unterscheiden sich mechanische Messungen von trockenem und feuchtem Knochen stark voneinander. Wasser befindet sich in den Fibrillen, in den Hohlräumen der Fibrillen und zwischen Kollagen-Molekülen (Weiner und Wagner, 1998). Es wird angenommen, dass Lipide auch beim Prozess der Mineralisation von Bedeutung sind, in dem sie Calcium-Ionen binden und mit Calciumphosphaten Komplexe bilden (Safadi et al., 2009).

1.1.3 Zellen des Knochens

Im Gewebe des Knochens gibt es drei spezifische Zelltypen: Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten (Abbildung 3). Knochenzellen machen ca. 10% des Knochenvolumens aus (Hadjidakis und Androulakis, 2006; Buck und Dumanian, 2012; Fernandez-Yague et al., 2014). Für die Knochenbildung und die Mineralisation sind vorrangig die Osteoblasten verantwortlich, während die Osteoklasten Knochen resorbieren. Die Knochendichte im erwachsenen Menschen wird lokal durch die Balance zwischen der osteoklastären Resorption und der osteoblastären Knochenneubildung bestimmt. Kommt es zu einer Störung des Gleichgewichtes, bei dem mehr Knochen abgebaut wird (u.a. durch fehlende mechanische Belastung, Vitamin D und Calcium-Mangel oder im Rahmen der Hormonumstellung in der Menopause bei Frauen), führt dies zur Osteoporose des Knochengewebes (Harada und Rodan, 2003; Delaney, 2006).

Beim Knochenumbauprozess kooperieren Osteoklasten und Osteoblasten eng miteinander. Die Kommunikation zwischen diesen Zellen und auch den Osteozyten ist sehr wichtig für die Aufrechterhaltung der Balance zwischen Knochenabbau und Knochenaufbau im gesunden Knochen. Osteoblasten exprimieren den Liganden RANKL, welcher mit dem Transmembranprotein RANK, einem Rezeptor auf Osteoklasten-Vorläuferzellen, interagiert und zur Reifung, Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten führt. Danach beginnt der Prozess der Resorption. Durch Osteoprotegerin, hauptsächlich sezerniert durch Osteoblasten, wird der Effekt von RANKL blockiert und die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten inhibiert (Hadjidakis und Androulakis, 2006; Caetano-Lopes et al., 2009). Kommt es zu einer Störung der Zellkommunikation und damit der Balance zwischen Knochenabbau und Aufbau führt dies zu pathologischen Situationen, wie z.B. Osteoporose (Hadjidakis und Androulakis, 2006).

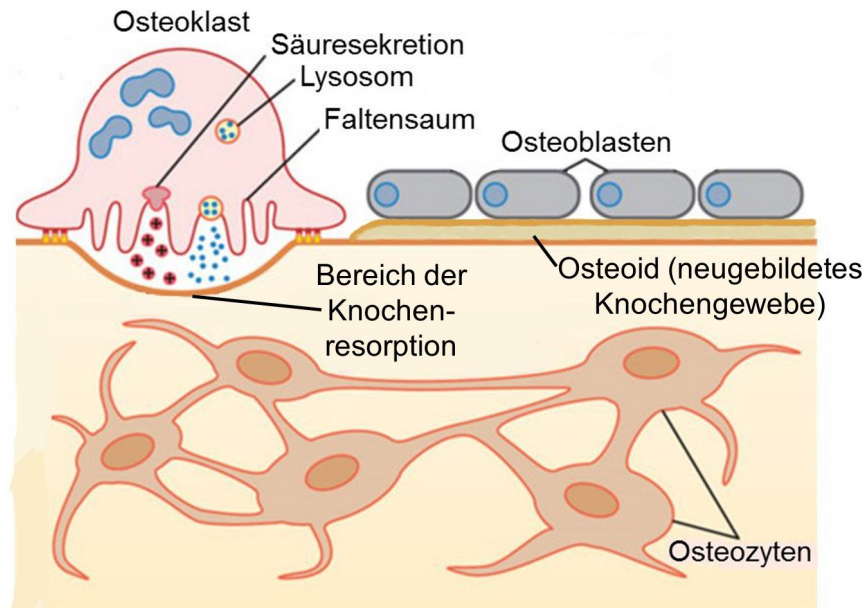


Abbildung 3: Schematische Abbildung der am Knochenmetabolismus beteiligten Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten (verändert nach Hall und Guyton, 2011)

Osteoblasten

Osteoblasten sind spezialisierte Zellen, die organische Knochenmatrix synthetisieren und sezernieren und den Prozess der Mineralisation steuern. Sie differenzieren sich aus mesenchymalen Stammzellen (MSC). Es können vier grundlegende Reifestadien bei der osteoblastären Differenzierung unterschieden werden: Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten, ruhende Knochenzellen (*bone lining cells*) und Osteozyten (Mackie, 2003; Meyer und Wiesmann, 2006). Bei entsprechender Stimulation werden zuerst Osteoprogenitorzellen gebildet, welche noch proliferative Fähigkeiten haben (Safadi et al., 2009). Sie bleiben so lange undifferenziert, bis sie von Signalen aktiviert werden, um an die Stelle der Knochenneubildung zu migrieren, zu proliferieren und sich letztendlich zu Osteoblasten zu differenzieren (Buck und Dumanian, 2012). Osteoprogenitorzellen liegen in Haversschen Kanälen, dem Endosteum (dünne Bindegewebsschicht, welches den inneren kompakten Knochen und den trabekulären Knochen überzieht), den inneren Schichten des Periosteums und im Knochenmark vor (Meyer und Wiesmann, 2006; Safadi et al., 2009; Buck und Dumanian, 2012).

Osteoblasten haben eine kubische Form und befinden sich meist dicht gepackt auf der Oberfläche des trabekulären oder kortikalen Knochens, bei welchem Knochengewebe aktiv gebildet oder umgebaut wird oder beim Heilungsprozess von Frakturen (Franz-Odendaal et al., 2006; Hadjidakis und Androulakis, 2006; Safadi et al., 2009). Die Knochenbildung kann in drei aufeinanderfolgende Phasen gegliedert werden: die Produktion, Reifung und Mineralisation osteoider Matrix (Hadjidakis und Androulakis, 2006). Die Aktivität von Osteoblasten ist durch die enzymatische Aktivität der alkalischen Phosphatase gekennzeichnet, einem frühen Marker der osteogenen Differenzierung. Neben der Produktion von Kollagen Typ I und

Proteoglykanen werden auch weitere nicht-kollagene Proteine (Osteocalcin, Osteopontin, *bone sialoprotein* und Osteonektin), aber auch Zytokine (Interleukin-6 und -11) und Wachstumsfaktoren (TGF- β , BMP's, PDGF's, IGF's) sezerniert (Mackie, 2003; Hadjidakis und Androulakis, 2006; Meyer und Wiesmann, 2006; Hofmann et al., 2009).

Nach Abschluss der Knochenbildung gibt es drei mögliche Wege für die Osteoblasten: *bone lining cells* zu werden, sich zu Zellen der Osteoprogenitorlinie zurück zu entwickeln oder Osteozyten zu werden (Hadjidakis und Androulakis, 2006)). *Bone lining cells* sind im Gegensatz zu den Osteoblasten metabolisch inaktiver und befinden sich als flache, dünne und gestreckte Zellen auf Knochenoberflächen, bei denen kein Umbau stattfindet (Meyer und Wiesmann, 2006). Wenn sich Osteoblasten gegen Ende der Matrix-produzierenden Periode im Knochengewebe einschließen, differenzieren sie zu Osteozyten (Mackie, 2003; Hadjidakis und Androulakis, 2006).

Osteozyten

Osteozyten sind die am zahlreichsten auftretenden Zellen im Knochen. Es wird angenommen, dass sie bis zu 10-mal häufiger im erwachsenen menschlichen Knochen vorkommen als Osteoblasten und 90-95% der Knochenzellpopulation ausmachen. Sie sind umgeben von organischer Matrix und existieren innerhalb von Vakuolen, auch lat. *lacuna* genannt (Meyer und Wiesmann, 2006; Bellido, 2014; Schaffler et al., 2014). Osteozyten verlieren eine Vielzahl osteoblastärer Merkmale, prägen gleichzeitig aber, im eingeschlossenen Zustand, spezifische neue morphologische Merkmale aus. Reife Osteozyten haben eine sternförmige oder verzweigte Struktur. Durch die Ausbildung von zytoplasmatischen Fortsätzen (*canaliculi*), welche den Knochen durchziehen, kommen sie in Kontakt mit umliegenden Osteozyten, was ihnen eine direkte Zell-Zellkommunikation erlaubt (Bellido, 2014; Compton und Lee, 2014; Schaffler et al., 2014). Es wird angenommen, dass die Ausbildung eines Netzwerkes aus Osteozyten auch eine wesentliche Rolle in der Zellkommunikation zwischen Osteoblasten und Osteoklasten spielt, um die funktionelle Anpassung des Knochens, ausgehend von externer Stimulation, zu beeinflussen (Rho et al., 1998; Meyer und Wiesmann, 2006; Bellido, 2014; Schaffler et al., 2014). Dabei wird die Knochenneubildung (Osteoblasten) durch die Sezernierung des Proteins Sklerostin von Osteozyten gesteuert, während die Expression von RANKL und OPG die Knochenresorption (Osteoklasten) reguliert (Bellido, 2014; Compton und Lee, 2014). Ihre Funktionen sind neben der Erhaltung der Knochenmatrix, der Funktion als mechanosensitive Zellen und der Beteiligung an der Aufrechterhaltung der Calciumhomöostase, auch die direkte Resorption von Knochen durch das Parathormon (PTH) (Meyer und Wiesmann, 2006; Bellido, 2014; Schaffler et al., 2014).

Osteoklasten

Osteoklasten sind große mehrkernige Zellen, gewöhnlich mit 3 bis 25 Zellkernen und einem Durchmesser von bis zu 100 µm. Im Gegensatz zu Osteoblasten und Osteozyten reifen Osteoklasten aus hämatopoetischen Stammzellen (HSC) und gehören zur Familie der Monozyten/Makrophagen. Osteoklasten befinden sich meistens in Kontakt mit der calcifizierten Knochenoberfläche (Mackie, 2003; Hadjidakis und Androulakis, 2006; Charles und Aliprantis, 2014). Sie haben die Fähigkeit Mineral zu lösen und die organische Matrix abzubauen. Nachdem ein Osteoklast auf der Knochenoberfläche, durch die Bindung von Integrinen an spezifische Aminosäuresequenzen von Proteinen auf der Oberfläche adhäriert, bildet sich unter der Zelle eine Anheftungszone aus. Dabei verbindet sich die Plasmamembran der Zelle mit der Oberfläche und dichtet die Resorptionstelle ab. Der Knochen wird von Osteoklasten durch Ansäuerung und Proteolyse der Knochenmatrix in einer flachen Vertiefung (Resorptionslakune) resorbiert (Hadjidakis und Androulakis, 2006; Charles und Aliprantis, 2014). Es gibt viele bekannte Faktoren und Zytokine, welche die Osteoklastenbildung und –aktivität regulieren, einschließlich der Rezeptoraktivatoren des NF-κB-Liganden, Osteoprotegerin, Interleukin-1, Interleukin-6, dem Makrophagen-Koloniestimulierendem Faktor, Parathormon, 1,25-Dihydroxyvitamin D und Calcitonin (Mackie, 2003; Hadjidakis und Androulakis, 2006; Safadi et al., 2009; Charles und Aliprantis, 2014).

1.2 Knochenregeneration

Knochengewebe ist ein dynamisches Gewebe, welches kontinuierlich umgebaut wird. Dieser Umbauprozess involviert die Resorption von vorhandenem Knochen und die anschließende Bildung von neuem Knochengewebe. Dadurch besitzt es in hohem Maße die Fähigkeit sich selbst zu regenerieren; bei der Heilung von Frakturen oder dem kontinuierlichen Umbau zur Sicherung der Qualität des Knochens (Hadjidakis und Androulakis, 2006; Meyer und Wiesmann, 2006; Safadi et al., 2009; Dimitriou et al., 2011; Buck und Dumanian, 2012). Es wird angenommen, dass der Umbau von Knochengewebe in „gebündelten Einheiten“ verstreut im ganzen Skelettsystem stattfindet, wobei der Umbau einer „Einheit“ eine Zeit von 3-4 Monaten in Anspruch nimmt. Jährlich werden dabei ca. 25% des trabekulären Knochens und 2-3% des kompakten Knochens umgebaut (Safadi et al., 2009; Buck und Dumanian, 2012).

Bei der physiologischen Frakturheilung wird das verletzte Knochengewebe mit den ursprünglichen mechanischen und physikalischen Eigenschaften und ohne die Bildung von Narbengewebe wiederhergestellt. Der Heilungsprozess erfolgt dabei in drei sich überlappenden Phasen: 1) einer frühen Entzündungsphase, 2) der Reparaturphase und 3) der späten Umbauphase (siehe Abbildung 4). Bei der Entzündungsphase (1) kommt es zur Bildung eines Hämatoms aufgrund der Zerstörung von Blutgefäßen innerhalb der Fraktur. Bei einer Entzündungsreaktion wird vaskularisiertes Granulationsgewebe hauptsächlich durch

Angioblasten, Fibroblasten und Makrophagen gebildet. Während der anschließenden Reparaturphase (2) bildet sich ein weicher Kallus (v.a. Knorpel) aus vaskularisiertem Granulationsgewebe, der langsam mineralisiert und zu einem harten Kallus wird. Fibroblasten bilden eine extrazelluläre Matrix in dem weichen Kallus, welche das Einwachsen von neuen Blutgefäßen unterstützt. Mit fortschreitender Vaskularisierung wird eine Kollagenmatrix sezerniert, während neues weiches Knochengewebe (Osteoid) gebildet und mineralisiert wird. Die Frakturheilung wird durch die anschließende Umbauphase (3) abgeschlossen, bei der das gebildete Gewebe durch Knochengewebe mit spezifischer Form, Struktur und mechanischer Stärke ersetzt wird (Kalfas, 2001; Carano und Filvaroff, 2003).

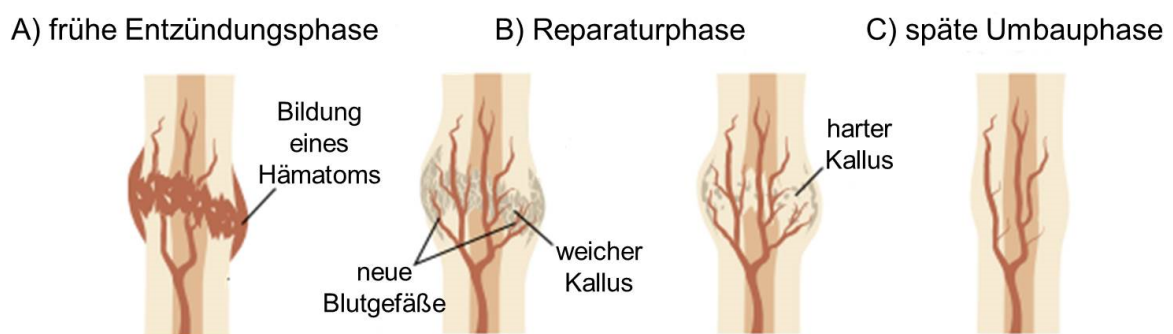


Abbildung 4: Phasen der Frakturheilung von Knochengewebe (verändert nach Carano und Filvaroff, 2003)

Trotz der Regenerationsfähigkeit des Knochens gibt es häufig Fälle von Frakturen (z.B. 13% der Frakturen im Bereich des Schienbeins), bei der die Regeneration des Knochens beeinträchtigt ist und die Selbstheilungskräfte des Knochens nicht ausreichen. Bei Defekten, welche eine kritische Größe überschreiten (verursacht durch Trauma, Tumoresektionen oder Infektionen), im systemisch erkrankten Knochen (z.B. bei Osteoporose oder Diabetes) oder bei vorbestrahltem Knochengewebe wird bei einer Knochenrekonstruktion eine große Menge an neuem Knochengewebe benötigt (Clokier et al., 2002; Mastrogiacomo et al., 2005; Dimitriou et al., 2011; Miron und Zhang, 2012). Der „Gold-Standard“ um solche Defekte zu therapieren, ist die Transplantation von autologem Knochen. Hierbei wird Knochengewebe vom Patienten selbst entnommen und danach in den Defekt eingesetzt (Schmidt-Rohlfing et al., 2009; Dimitriou et al., 2011; Fernandez-Yague et al., 2014). Das regenerative Potential von Knochentransplantaten ist durch drei Mechanismen bestimmt: 1. Auffüllung mit einer osteokonduktiven Matrix, welche Gefäßeinsprossung und Einwachsen von Zellen begünstigen, 2. Einbringen von osteoinduktiven Faktoren, welche mesenchymale Stammzellen stimulieren, sich zu reifen, knochenbildenden Zellen zu differenzieren und 3. Einbringen von osteogenen Zellen, welche imstande sind, neue Knochenmatrix zu bilden (Miron und Zhang, 2012). Dem entsprechend ist der „Gold-Standard“ gekennzeichnet durch die optimale Kombination von Osteokonduktion (Eigenschaft eines Materials, eine Matrix für die Knochenneubildung zu

liefern) und Osteoinduktion (Fähigkeit, Knochenneubildung anzuregen) durch die Anwendung von körpereigenem (autologem) Knochengewebe (Orban et al., 2002; Mastrogiacomo et al., 2005; Dimitriou et al., 2011; Miron und Zhang, 2012). Allerdings sind mit dieser Variante auch entscheidende Nachteile, wie die limitierte Verfügbarkeit und zusätzliche Entnahme von gesundem körpereigenem Knochen notwendig, welches das Infektionsrisiko und auch die Kosten steigert, verbunden (Orban et al., 2002; Miron und Zhang, 2012). Knochen von einem anderen Individuum gleicher Spezies (allogen) ist die am meisten genutzte Alternative zum autologen Knochentransplantat. Aber auch hier gibt es Einschränkungen, wie das Risiko von Krankheiten, die durch Blut übertragen werden können und die strikte Gesetzesregelung bezüglich der Anwendung und Lagerung von humanen Gewebe (Clokier et al., 2002; Mastrogiacomo et al., 2005). Aber auch prozessierte Transplantate von anderen Spezies (Xenografts) wurden erfolgreich verwendet.

Als Alternative zum natürlichen Knochengewebe kommen immer häufiger Knochenersatzmaterialien (körperfremdes Material (Alloplast)) aus resorbierbaren oder nicht resorbierbaren Materialgruppen, wie Keramiken, Polymeren oder Metallen, zur Anwendung (Orban et al., 2002; Miron und Zhang, 2012; Oryan et al., 2014; Tevlin et al., 2014). Viele der zurzeit verfügbaren Knochenersatzmaterialien basieren auf keramischen Materialien, wozu Calciumphosphate, Calciumsulfate und bioaktive Gläser (alleine oder in Kombination) zählen. Sehr häufig werden Calciumphosphate verwendet, da der anorganische Bestandteil des Knochens aus Hydroxylapatit besteht und sie durch die chemisch ähnliche Zusammensetzung osteokonduktiv sind. Des Weiteren können sie eine poröse Struktur haben und sind biokompatibel und biodegradabel (Eppley et al., 2005; Kneser et al., 2006; Laurencin et al., 2006; Oryan et al., 2014). Neben den Keramiken gibt es z.B. Knochenersatzmaterialien auf Polymerbasis. Diese resorbierbaren Polymere, basierend auf α -Hydroxysäuren, werden im menschlichen Körper durch Hydrolyse abgebaut und metabolisch in Wasser und Kohlenstoffdioxid umgewandelt. Aber auch abbaubare Polymere aus Polymilchsäuren (PLA) kommen zur Anwendung. Sie sind mechanisch elastischer und nicht so spröde wie Keramiken und können in ihrer Architektur der Struktur des Knochens angepasst werden (Eppley et al., 2005; Laurencin et al., 2006; Tevlin et al., 2014). Metalle, wie Titan oder Edelstahl, werden aufgrund ihrer mechanischen Eigenschaften (Stabilität, Biegsamkeit) häufig bei klinischen Anwendungen verwendet, obwohl eine Integration ins Knochengewebe bei den meisten Metallen fehlt (Tevlin et al., 2014). Ein großer Nachteil der genannten Knochenersatzmaterialien ist der Mangel an osteogenem Potential, welches die Regenerationskapazität stark einschränkt (Laurencin et al., 2006). Der Ansatz des Tissue Engineering bietet daher eine alternative Lösung für die Heilung größerer Knochendefekte (Orban et al., 2002).

1.3 Tissue Engineering des Knochens

1.3.1 Der klassische Tissue Engineering-Ansatz

Das relativ junge Forschungsgebiet des Tissue Engineering, entstanden im Zusammenhang mit den ersten erfolgreich gezüchteten Hautimplantaten Ende der 1970iger Jahre, wird durch seine Ziele definiert: die Heilung einer Verletzung, die Erhaltung, Regeneration oder Verbesserung von Gewebefunktionen oder sogar den Ersatz eines geschädigten Gewebes. Tissue Engineering ist ein interdisziplinäres Gebiet, welches die Prinzipien der Lebenswissenschaften, der Medizin und der Ingenieurwissenschaften zusammenbringt und drei wesentliche Bestandteile – Zellen, Trägermaterial und Signalmoleküle – vereint (Langer, 1993; Orban et al., 2002; Patel et al., 2002; Levenberg und Langer, 2004; Hench, 2005; Meyer et al., 2009; Berthiaume et al., 2011). Beim Knochen-Tissue Engineering werden dem Patienten üblicherweise mesenchymale Stammzellen, z.B. aus dem Beckenkamm, entnommen und zunächst unter Zellkulturbedingungen vermehrt. Anschließend wird das Trägermaterial (Scaffold) mit den Zellen besiedelt und kultiviert (Porter et al., 2009). Hierbei können die Zellen durch die Anwendung von Bioreaktoren physikalisch stimuliert werden (Patel et al., 2002; Schmidt-Rohlfing et al., 2009). Zusätzlich können Faktoren (im Medium gelöst oder am Trägermaterial gebunden) eingesetzt werden, die das Wachstum und die Differenzierung der Zellen steuern, so dass die Zellen eine Knochen-spezifische extrazelluläre Matrix bilden. Im finalen Schritt wird das Tissue Engineering-Konstrukt in den Knochendefekt implantiert. Dort erfolgt der sukzessive Umbau in natürliches Knochengewebe bei gleichzeitigem Abbau des Scaffoldmaterials (siehe Abbildung 5) (Porter et al., 2009).

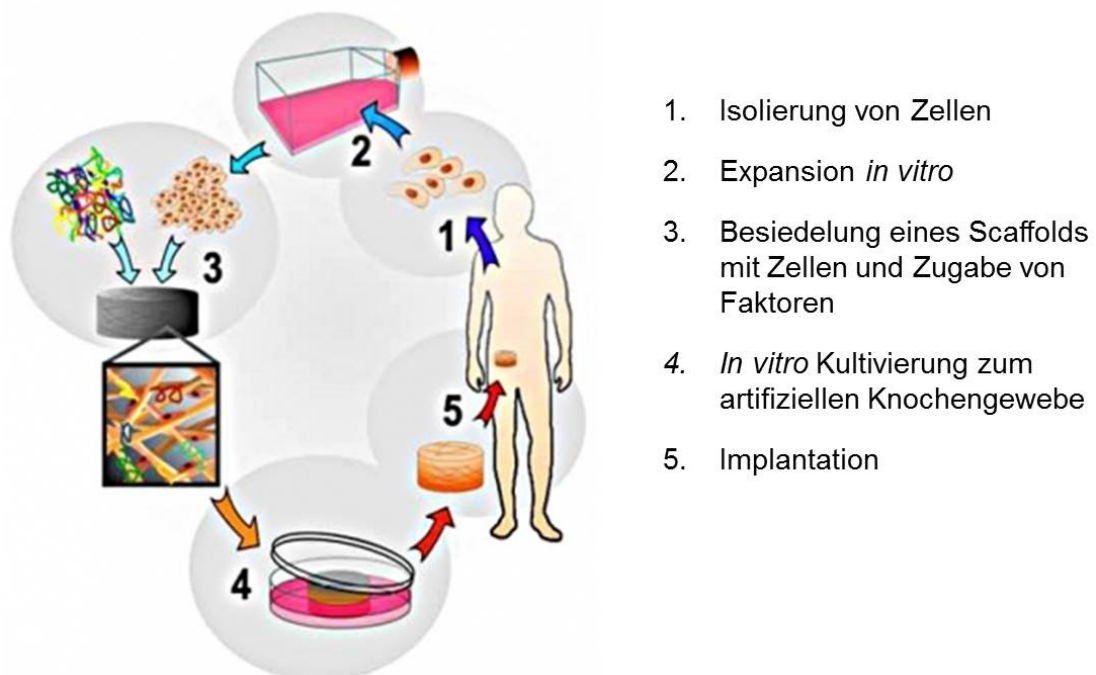


Abbildung 5: Schema des Knochen-Tissue Engineering (verändert nach Stevens, 2005)

Artifizielles Knochengewebe sollte demnach aus einer extrazelluläre Matrix (das so genannte **Scaffold**) bestehen, **Zellen** welche zu Osteoblasten differenzieren, und **Faktoren** (Adhäsions-, Proliferations-, Differenzierungs- und Migrationsfaktoren), die Mitogenese und Differenzierung von Zellen unterstützen (Orban et al., 2002; Mastrogiacomo et al., 2005; Miron und Zhang, 2012).

Scaffold

Die Scaffolds müssen für den Einsatz im Knochen eine Fülle von Bedingungen erfüllen, um eine optimale Regeneration des geschädigten Gewebes zu erzielen. Am wichtigsten ist hierbei die Biokompatibilität des Materials, so dass keine bzw. nur eine minimale Entzündungsreaktion hervorgerufen wird. Des Weiteren sollten Scaffolds eine adequate mechanische Stabilität aufweisen, wobei aber nur wenige Materialien (wie Metalle) mit den mechanischen Eigenschaften des Knochens (z.B. hohe Festigkeit) korrelieren. Das Scaffold sollte bioresorbierbar sein in dem Maße, dass die Abbaurate (hydrolytisch oder enzymatisch) der Regenerationsrate des Gewebes entspricht (Porter et al., 2009; Sundelacruz und Kaplan, 2009; Tevlin et al., 2014). Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Porengröße, welche laut Literatur zwischen 50 und 500 µm (50-150 µm (Jones et al., 2009; Sundelacruz und Kaplan, 2009), 100-300 µm (Schliephake et al., 1991; Jones und Hench, 2003; Harley et al., 2009), bzw. 100-500 µm (Hutmacher, 2001; Eppley et al., 2005)) liegen sollte. Zusätzlich ist eine interkonnektierende Porosität der Scaffolds von großem Vorteil. *In vitro* begünstigt eine hohe Porosität die Zellproliferation als auch die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff, *in vivo* fördert sie das Einwachsen von Blutgefäßen und Einwandern von Knochen- und deren Vorläuferzellen (Sundelacruz und Kaplan, 2009). Idealerweise dient das Scaffold auch als Trägermaterial für Faktoren (Wachstumsfaktoren, Zytokine oder chemoattraktive Faktoren), dabei sind die chemische Zusammensetzung, Oberflächenchemie (elektrochemisches Potential der Oberfläche) und Kristallinität des Materials Schlüsselfaktoren für eine effektive Beladung und zweckmäßige Freisetzungskinetik. Andere Faktoren, die für die klinische Anwendung von Bedeutung sind, sind die Herstellungsdauer, Kosten, Haltbarkeit und die Handhabung bei der Implantation (Hutmacher, 2000; Orban et al., 2002; Mao, 2008; Grayson et al., 2009; Meyer et al., 2009).

Für das Knochen-Tissue Engineering befinden sich Biomaterialien verschiedener Klassen als Scaffoldmaterial in der Entwicklung und teilweise schon in der klinischen Anwendung. In der nachfolgenden Tabelle sind die unterschiedlichen Materialklassen, Vor- und Nachteile im Tissue Engineering und Materialbeispiele dargestellt.

Tabelle 1: Materialklassen für das Knochen-Tissue Engineering und ihre Vor- und Nachteile (Orban et al., 2002; Meyer und Wiesmann, 2006; Meyer et al., 2009; Porter et al., 2009; Berthiaume et al., 2011; Fernandez-Yague et al., 2014; Tevlin et al., 2014)

Materialklasse	Vorteile	Nachteile	Beispiele
Natürliche Polymere	Gute Zellkompatibilität und Bioaktivität durch ihren natürlichen Ursprung, z.T. Ähnlichkeit zur extrazellulären Matrix, einfach zu verarbeiten und herzustellen	Können Entzündungsreaktionen hervorrufen, Degradation teilweise schlecht kontrollierbar, geringe mechanische Belastbarkeit, Infektionsrisiko, natürliche Schwankungen des Basismaterials verschlechtert die Reproduzierbarkeit	Kollagen Typ I, Alginate, Chitosan, Gelatine, Hyaluronsäure, Seiden-Fibroin
Synthetische Polymere	Geringe Gefahr der Immunogenität oder Krankheitsübertragung; Degradation, mechanische Stabilität, Porosität und Mikroarchitektur durch die chemische Herstellung kontrollierbar	Wasserabweisende Eigenschaften aufgrund ihrer Oberflächenladung bewirken eine geringere Bioaktivität als bei natürlichen Polymeren, teilweise schlechte Biokompatibilität der Abbauprodukte	PLA (Polylaktide), PGA (Polyglycolide), PCL (Polycaprolacton), Polyanhydride und Poly(propylen-Fumarate)
Keramiken und bioaktives Glas	Osteokonduktive Oberfläche, Absorption von bioaktiven Proteinen, damit Förderung der Adhäsion, Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten	Langsame Abbaurate, geringe Porosität (bei injizierbarer Form), limitierte mechanische Eigenschaften (hohe Sprödigkeit), geringe Biege- und Zugfestigkeit	β -Tricalciumphosphat (β -TCP), Hydroxylapatit (HAP), biphasische Calciumphosphate und Biogläser (z.B. 45S5)
Metalle	Mechanisch stabil (Härte, Dehnbarkeit), verarbeitungsfähig, relativ kostengünstig	„stress shielding“ (höherer E-Modul als das Knochengewebe, führt zu Abbau des umliegenden Knochens), größtenteils nicht resorbierbar, teilweise toxische Korrosionsprodukte (u.a. bei Eisen)	Titan, Edelstahl, Gold, Magnesium, Kobalt-Chrom

Komposite (bestehend aus mindestens 2 verschiedenen Materialklassen)	Kombination von Materialien, um deren Vorteile miteinander zu verbinden oder Nachteile des einen Materials durch die Vorteile des anderen Materials auszugleichen. Zum Beispiel kann die mechanische Festigkeit von polymer-basierten Scaffolds durch die Kombination mit Mineralphasen gesteigert werden oder die Beschichtung von HAP mit Kollagen bewirkt eine Steigerung der Bioaktivität des Materials. Die Herstellung von Kompositmaterialien kann sehr komplex sein.	Polymere mit Mikro/Nanopartikeln, Polymere mit Mikro-/Nanofasern, Scaffolds aus PLA/HAP, HAP/Kollagen/PCL
---	--	---

Scaffolds für das Knochen-Tissue Engineering können mit einer Reihe von verschiedenen Methoden hergestellt werden. Beim Gefriertrocknungsprozess beispielsweise werden poröse Scaffolds erzeugt, indem (Bio-)Polymere mit Wasser gemischt werden, um eine Suspension zu bilden, die anschließend eingefroren und dann gefriergetrocknet wird. Das Verfahren des *Gas foaming* nutzt Gase als Porogen, um einen porösen Scaffold herzustellen. Unter Anwendung von *Rapid-prototyping*-Methoden werden rechnerunterstützt 3D-Konstruktionen entwickelt und aus Polymeren u.a. gedruckt (Schmidt-Rohlfing et al., 2009; Berthiaume et al., 2011).

Zellen

Für das Tissue Engineering werden meist Vorläuferzellen oder Stammzellen verwendet, welche sich zu gewebespezifischen Zellen (wie z.B. Osteoblasten oder Chondrozyten) differenzieren lassen. Nach der Herkunft werden embryonale und adulte Stammzellen unterschieden. Embryonale Stammzellen werden aus Blastozysten gewonnen und sind pluripotent, was bedeutet, dass sie sich in Zellen des Meso-, Endo- und Ektoderms differenzieren können. Allerdings werden vorwiegend adulte Stammzellen für therapeutische Anwendungen genutzt, da bei der Verwendung von embryonalen Stammzellen entscheidende Limitationen, wie ethische Bedenken, begrenzte Verfügbarkeit und teilweise schwierige Kontrolle bei der Differenzierung bestehen. Adulte Stammzellen (z.B. hämatopoetische und mesenchymale Stammzellen) befinden sich in ausdifferenziertem Gewebe und können aus dem Blut, Knochenmark oder Fettgewebe isoliert werden (Wissink et al., 2001; Orban et al., 2002; Mao, 2008; Schmidt-Rohlfing et al., 2009). Sie werden als undifferenzierte Zellen definiert, welche die Fähigkeit haben, sich zu reproduzieren (Laschober et al., 2011) und in bestimmte gewebespezifische Zellen zu differenzieren (Orban et al., 2002; Mao, 2008; Sundelacruz und Kaplan, 2009). MSC, auch Knochenmark-Stromazellen, mesenchymale Stammzellen oder mesenchymale Stromazellen genannt, sind multipotente Zellen mesodermalen Ursprungs und werden häufig in der Forschung im Bereich des Knochen-Tissue Engineering eingesetzt (Keating, 2006; Giordano et al., 2007; Gelinsky et al., 2011; Tevlin et al., 2014). Sie haben

das Potential, sich neben Osteoblasten auch in andere Zelltypen wie Adipozyten, Chondroblasten, Fibroblasten und Muskelzellen zu differenzieren (Keating, 2006; Meyer und Wiesmann, 2006; Giordano et al., 2007; Safadi et al., 2009; Gelinsky et al., 2011). Allerdings ist die Anzahl isolierbarer Stammzellen aus den jeweiligen Geweben relativ gering und das Differenzierungspotential ist stark Alters- und Patienten-abhängig. Für die Kultivierung dieser Zellen, um eine notwendige Zellzahl für die Regeneration von Knochendefekten zu erreichen, kommt deshalb ein hoher Kosten-, Zeit- und Risikofaktor zustande (Levenberg und Langer, 2004; Mao, 2008; Tevlin et al., 2014).

Wachstumsfaktoren und Chemokine

Eine wichtige Strategie, um eine schnellere Defektheilung durch Stimulation der Zelldifferenzierung zu erzielen, ist neben dem richtigen Scaffoldmaterial und der Vorkultivierung mit Zellen auch der Einsatz von Signalmolekülen, welche zelluläre Funktionen (Adhäsion, Proliferation, Differenzierung und Bildung einer extrazellulären Matrix, sowie Migration) durch das Binden an spezifische Rezeptoren in der Zellmembran aktivieren (Blitterswijk, 2008; Mao, 2008; Meyer et al., 2009). Durch den Einsatz von verschiedenen Wachstumsfaktoren können gezielt eine oder mehrere Funktionen der Zellen angeregt und gefördert werden. Eine wichtige Rolle bei der Regeneration von Knochengewebe haben Faktoren der TGF- β -Familie, wie *bone morphogenic proteins* (BMP-2 und BMP-7) und die *transforming growth factors* (TGF- β 1-3), sowie der *fibroblast growth factor* (FGF), *insulin-like growth factor* (IGF) und *platelet-derived growth factor* (PDGF), welche Knochenbildung induzieren können (Blitterswijk, 2008; Mao, 2008; Meyer et al., 2009; Oryan et al., 2014). In vielen klinischen Studien konnte besonders die Wirksamkeit von BMP-2 (Fu et al., 2008; He et al., 2013; Kuhn et al., 2013; Sun et al., 2013) und BMP-7 (Lu et al., 2009; Barr et al., 2010; Sun et al., 2012; Lee et al., 2013) bei der Frakturheilung und Knochenneubildung nachgewiesen werden. Die Zellen können durch die zusätzliche Verwendung von Chemokinen aus dem umliegenden Knochengewebe in Richtung des Implantatmaterials angelockt werden. Hierbei haben u.a. die Faktoren SDF-1 α , PDGF und verschiedene BMP's eine chemoattraktive Wirkung auf hMSC (Fiedler et al., 2002; Mishima und Lotz, 2008; Otsuru et al., 2008; Thieme et al., 2009).

Limitationen des Knochen-Tissue Engineerings

Ein gravierender Nachteil des Tissue Engineerings bzw. der dazu notwendigen Kultivierung von Zellen auf großen Trägermaterialien *in vitro* bzw. nach der Implantation in Knochengewebe *in vivo* ist das Fehlen eines Netzwerkes aus Mikrokapillaren. Dadurch kommt es zu einer Limitation der Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen. Bei Scaffoldmaterialien mit mehreren Millimetern in Breite und Höhe ist es äußerst schwierig, Zellen im Inneren

am Leben zu erhalten. *In vitro* kann dieses Problem durch den Einsatz von Perfusionsbioreaktoren umgangen werden, aber *in vivo* reicht die Fähigkeit des Körpers zur Vaskularisierung in der ersten Phase nach der Implantation nicht aus, um das Scaffold ausreichend schnell zu vaskularisieren. Das Einwachsen von Blutgefäßen in ein Scaffold verläuft mit einer relativ langsamen Geschwindigkeit von <1 mm/Tag (Santos und Reis, 2010). Die Versorgung mit wichtigen Nährstoffen und Sauerstoff sowie der Abtransport von Abfallprodukten mittels Diffusion ist auf eine Entfernung von 100-200 μm limitiert, so dass es in tieferen Regionen des Scaffolds zu hypoxischen Bedingungen und zum Mangel an Nährstoffen kommt, wodurch Zellen bereits nach Stunden bis hin zu wenigen Tagen absterben (Hutmacher, 2000; Patel et al., 2002; Kanczler und Oreffo, 2008; Rivron et al., 2008; Grayson et al., 2009; Kaully et al., 2009; Santos und Reis, 2010; Berthiaume et al., 2011). Für die Heilung von Knochengewebe, besonders bei großen Defekten, ist das schnelle Einwachsen von Blutgefäßen in das Scaffold daher essentiell (Meyer und Wiesmann, 2006).

1.3.2 Angiogenese und angiogene Wachstumsfaktoren

Um die Vaskularisierung und damit die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen zu gewährleisten, werden Trägermaterialien im Tissue Engineering entweder *in vitro* prävasikularisiert (Fidkowski et al., 2005; Borenstein et al., 2007) oder mit angiogenen Faktoren beladen (Kaully et al., 2009; Santos und Reis, 2010), welche im Körper den Vorgang der Angiogenese stimulieren (Orban et al., 2002; Kanczler und Oreffo, 2008; Rivron et al., 2008; Berthiaume et al., 2011). Zu den Angiogenese-stimulierenden Faktoren zählen u.a. Angiogenin, Angiopoietin-1 und 2, BMP-9, BMP-10, E-Cadherin, FGF, *Granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF), Interleukin-8, PDGF, Pleiotrophin, Proliferin, TGF- α , TGF- β und VEGF (Pardue et al., 2008; Rusnati und Presta, 2014; Stegen et al., 2014).

Die Aussprossung von Blutgefäßen aus bereits vorhandenen wird als Angiogenese bezeichnet (Klagsbrun und D'Amore, 1996; Roy et al., 2006; Zieris et al., 2011). Der Prozess der Angiogenese (siehe Abbildung 6) wird durch eine Vielzahl von Faktoren (wie VEGF, bFGF, PDGF, TGF- β) eingeleitet und kontrolliert und lässt sich durch den Ablauf mehrerer aufeinanderfolgender Schritte beschreiben. Zuerst werden die Endothelzellen durch verschiedene Faktoren (wie dem *Hypoxia-Inducible Factor-1 α* (HIF-1 α)) (Pardue et al., 2008) aktiviert und beginnen, durch die Absonderung von Proteasen, die umliegende extrazelluläre Matrix des Blutgefäßes zu degradieren. Bei der Degradation werden lösliche Faktoren freigesetzt, die wiederum eine Migration der Endothelzellen in die Zellzwischenräume bewirken, wo sie proliferieren. Danach formt sich durch Zusammenlagerung von Endothelzellen die tubuläre Vorläuferstruktur eines Kapillargefäßes, wobei die Proliferation der Endothelzellen gestoppt wird und die neu synthetisierte Struktur durch Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen stabilisiert wird. Glatte Muskelzellen und Perizyten umschließen die Kapillaren und stabilisieren so

die neu geformten Blutgefäße. Anschließend beginnt die Durchblutung des neu geformten Kapillargefäßes (Breier, 2000; Lee et al., 2007; Pardue et al., 2008).

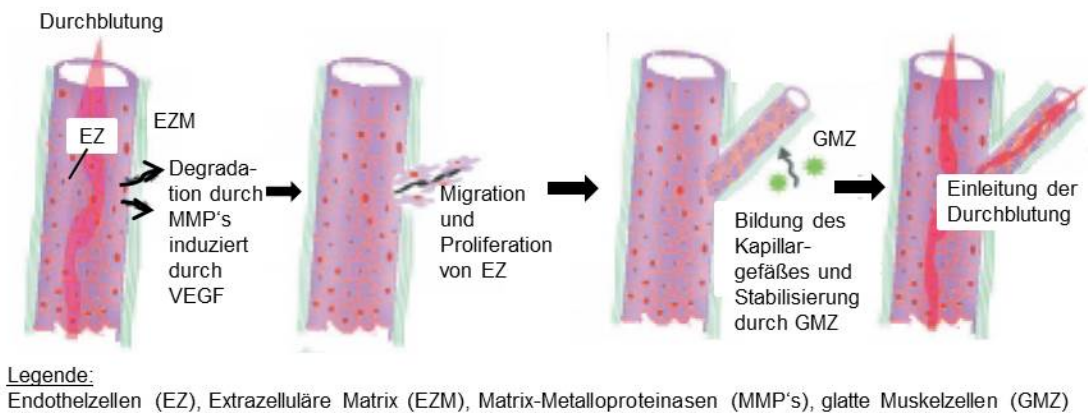


Abbildung 6: Prozess der Angiogenese (verändert nach Lee et al., 2007)

1.3.3 VEGF als Schlüsselfaktor der Angiogenese

Wie zuvor erwähnt, ist eine Versorgung von vorbesiedelten Scaffoldmaterialien durch Blutgefäße nach Implantation im Bereich des Knochens essentiell. Neben dem Prozess der Angiogenese ist die Chemoattraktion von Zellen (Kneser et al., 2006; Chen et al., 2011; Vanden Berg-Foels, 2014) aus dem umliegenden Gewebe in das Scaffold ein weiterer wichtiger Punkt zur Unterstützung der Defektregeneration. Im Folgenden wird der vaskuläre Endothelzellwachstumsfaktor (VEGF) näher beschrieben, welcher neben seiner Schlüsselrolle bei der Angiogenese auch chemoattraktiv auf verschiedene andere Zelltypen wirkt.

VEGF-Familie

Die VEGF-Familie setzt sich aus sieben Mitgliedern zusammen: VEGF-A, -B, -C, -D, -E und -F sowie dem plazentalen Wachstumsfaktor (PlGF). Sie besitzen ein gemeinsames Aminosäuresequenzmotiv aus 8 charakteristisch angeordneten Cysteinresten in einem hochhomologen Bereich der VEGF-Sequenz. Jede Form hat verschiedene biochemische und funktionelle Eigenschaften (z.B. Induktion der Angiogenese (VEGF-A), angiogenes Potential bei Entzündungsreaktionen (VEGF-B) oder bei der Lymphangiogenese (VEGF-C und D)) und wirken durch spezifische Tyrosin-Kinaserezeptoren (VEGFR-1, -2 und -3) (Roy et al., 2006). Bei dem Wachstumsfaktor VEGF-A gibt es mindestens 6 verschiedene Isoformen, welche durch alternatives mRNA-Spleißen entstehen und sich durch die unterschiedliche Anzahl an Aminosäureresten (121, 145, 165, 183, 189 und 206) unterscheiden (Klagsbrun und D'Amore, 1996; Ferrara, 1999; Roy et al., 2006; Lee et al., 2007; Vanden Berg-Foels, 2014).

Funktion von VEGF-A

VEGF-A ist ein wichtiger Schlüsselfaktor in der Angiogenese, der die Proliferation, Migration, Aussprossung von Endothelzellen und Tubebildung stimuliert. Neben starker angiogener Effekte induziert VEGF-A die Aktivierung von hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark und die Migration von Monozyten (Klagsbrun und D'Amore, 1996; Breier, 2000; Roy et al., 2006; Lee et al., 2007; Shen et al., 2008; Clarkin und Gerstenfeld, 2013; Vanden Berg-Foels, 2014).

Es besteht außerdem ein enger Zusammenhang zwischen der Vaskularisierung von Knochengewebe und der Knochenbildung, bei dem VEGF eine große Bedeutung hat. Hierbei wird durch die Erhöhung der Genexpression von HIF-1 α und VEGF in Osteoblasten speziell die Knochenbildung und Angiogenese gefördert (Wang et al., 2007; Clarkin und Gerstenfeld, 2013). In einer *in vitro* Studie von Fiedler et al. konnte nachgewiesen werden, dass VEGF eine chemoattraktive Wirkung auf primäre humane Osteoblasten hat, welches die Annahme zulässt, dass es eventuell in die lokale Rekrutierung von Knochenzellen involviert ist (Fiedler et al., 2005). Zusätzlich zu den erwähnten Effekten auf verschiedene Zelltypen induziert VEGF indirekt (Filvaroff, 2003), durch stimulierte Endothelzellen, und direkt (Midy und Plouët, 1994; Mayr-Wohlfart et al., 2002) die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten.

VEGF wird von vielen verschiedenen Zelltypen produziert wie Makrophagen, T-Zellen, glatte Muskelzellen, Nierenzellen, Keratinozyten, Osteoblasten, aber auch von den meisten Tumorzellen (Klagsbrun und D'Amore, 1996; Vanden Berg-Foels, 2014). Die Genexpression von VEGF wird, *in vivo* als auch *in vitro*, durch die lokalen Sauerstoffkonzentrationen reguliert. So induzieren hypoxische Bedingungen über den Transkriptionsfaktor HIF-1 α (Pardue et al., 2008; Clarkin und Gerstenfeld, 2013) die VEGF-Produktion im Knochen und in anderen Geweben (Ferrara, 1999; Breier, 2000; Roy et al., 2006; Clarkin und Gerstenfeld, 2013).

VEGF-A₁₆₅

In der Arbeit wurde die häufigste und wichtigste Isoform des Wachstumsfaktors, VEGF-A₁₆₅, verwendet, um Proliferations-stimulierende und chemoattraktive Effekte auf Endothelzellen auszulösen. VEGF-A₁₆₅ (im Folgenden kurz VEGF genannt) ist ein basisches, an Heparin bindendes, homodimerisches Glykoprotein mit einer Größe von ca. 45 kDa. VEGF-A₁₆₅ weist eine optimale Bioaktivität und –verfügbarkeit innerhalb der VEGF-Familie auf. Durch die Bindung an Heparin wird die Struktur stabilisiert und die Bioaktivität erhöht. Im menschlichen Körper ist es besser verfügbar als andere VEGF-Formen (u.a. VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆), da es löslich und diffusionsfähig ist (Klagsbrun und D'Amore, 1996; Ferrara, 1999; Fiedler et al., 2005; Roy et al., 2006; Lee et al., 2007; Vanden Berg-Foels, 2014).

Konzentrationsabhängige Wirkung

VEGF-A ist auch der Hauptvermittler der Angiogenese in einer Vielzahl von Tumoren. Andere physiologische und pathologische Prozesse sind mit der Hochregulierung von VEGF und VEGF-Rezeptoren verbunden; dazu zählen Wundheilung, Schlaganfall, Herzkrankheiten, diabetische Retinopathie und Osteoporose (Ferrara, 1999; Breier, 2000; Roy et al., 2006; Pardue et al., 2008; Clarkin und Gerstenfeld, 2013). VEGF wirkt in einer strikt dosisabhängigen Weise auf die Endothelzellen oder deren Vorläuferzellen während der frühen vaskulären Entwicklung. Erhöhte Konzentrationen von VEGF können Dichte, Durchmesser und Durchlässigkeit der Blutkapillaren verändern. Allerdings kann es auch bei der Injizierung von VEGF (im Rahmen einer Therapie) am Anfang der Vaskulogenese zu einem abnormalen Muster und exzessiver Fusion von Kapillaren kommen (Klagsbrun und D'Amore, 1996; Breier, 2000; Roy et al., 2006). Aufgrund dieser Erkenntnisse und der Tatsache, dass eine zusätzliche VEGF-Versorgung (Bolusinjektion) *in vivo* durch einen enzymatischen Abbau des VEGF nicht förderlich ist und hohe Dosen sehr kostspielig sind, fokussieren sich aktuelle Ansätze zur Förderung der Angiogenese auf die lokale und langanhaltende Freisetzung von VEGF aus Trägermaterialien (Geiger et al., 2005; Santos und Reis, 2010). Die Etablierung von geeigneten Drug Delivery-Systemen die Regeneration von Knochengewebe im Sinne eines alternativen Ansatzes des Tissue Engineerings wird im folgenden Kapitel beschrieben.

1.3.4 *In situ*-Tissue Engineering

In situ-Tissue Engineering, auch als lokal gesteuerte (*in situ guided*) Geweberegeneration oder lokales Tissue Engineering bezeichnet (Jakob et al., 2012), ist ein alternativer Ansatz zum Tissue Engineering, der auf die Vorbesiedlung von Trägermaterialien *in vitro* verzichtet. Beim *in situ*-Tissue Engineering sollen vor allem mit Chemokinen funktionalisierte Scaffolds verwendet werden, um körpereigene Stamm- und Vorläuferzellen anzulocken und gerichtet in das implantierte Scaffold migrieren zu lassen (Chen et al., 2011; Jakob et al., 2012; Ko et al., 2012; Ko et al., 2013; Vanden Berg-Foels, 2014). Die Anlockung oder auch Rekrutierung von diesen Zellen geschieht durch Chemotaxis, einen Vorgang, der die direkte Migration der Zellen in Richtung eines Gradienten aus löslichen chemoattraktiven Substanzen beschreibt (Kneser et al., 2006; Chen et al., 2011; Vanden Berg-Foels, 2014). Chemoattraktive Substanzen sind unter anderem VEGF (hauptsächlich Mobilisierung von blutgefäßbildenden Zellen) (Klagsbrun und D'Amore, 1996; Breier, 2000; Roy et al., 2006), IGF (Muskelvorläuferzellen) (Mourkioti und Rosenthal, 2005) und SDF-1 α (MSC und HSC) (Thieme et al., 2009; Ko et al., 2012).

Im Bereich der Knochenregeneration werden immer mehr injizierbare Materialien entwickelt, welche auf einem Material oder einer Kombination aus anorganischen und organischen Materialien basieren (Kretlow et al., 2007). Bei Hydrogelsystemen können die beladenen Wachs

tumsfaktoren durch den enzymatischen Abbau (z.B. Hyaluronsäure durch Hyaluronidasen) im Körper kontrolliert freigesetzt werden. So zeigten Tierstudien mit einem BMP-2 beladenen, auf PEG-basierenden Hydrogel bereits beachtliche Erfolge bei der Regeneration von kritischen Knochendefekten in Ratten (Lutolf et al., 2003). Neben den injizierbaren Materialien werden im Bereich der *in situ* Knochenregeneration vor allem Materialien aus Calciumphosphat untersucht (Ko et al., 2013). In der Studie von (Barnes et al., 2005) bewirkte hier ein Calciumphosphat/Kollagen-Kompositmaterial die Knochenneubildung in Primaten.

Wie zuvor erwähnt, wird auf die Vorbesiedlung der Scaffoldmaterialien mit Zellen beim *in situ*-Tissue Engineering verzichtet. Bis heute, gibt es keine klinischen Empfehlungen hinsichtlich der optimalen MSC-Population für Zell-basierte Therapien (Lepperdinger et al., 2008). Es konnte kein überzeugender Beweis dafür vorgelegt werden, dass beim Tissue Engineering von z.B. Knochengewebe eingesetzte MSC bei der Heilung und Regeneration des Gewebes beteiligt waren bzw. wie die zellulären Mechanismen zur Heilung abliefen (Jakob et al., 2012). Daher erscheint die Entwicklung von Strategien zur verstärkten Rekrutierung körpereigener Zellen mit regenerativem Potential als sinnvolle Alternative. Allerdings gibt es bei körpereigenen Stammzellen auch Defizite. Im höheren Alter nehmen spezifische Marker von MSC, wie die alkalische Phosphatase (osteogene Differenzierung), ab (Nishida et al., 1999; Muschler et al., 2001; Stolzing et al., 2008) und mesenchymale Vorläuferzellen zeigen vermehrt einen pro-inflammatorischen Phänotyp auf. Zusätzlich scheint es, dass sie die Differenzierung zu Fettzellen, anstatt der Differenzierung zu Osteoblasten, vorziehen (Laschober et al., 2011).

1.3.5 Drug Delivery von Faktoren und Chemokinen

Wachstumsfaktoren und Chemokine verlieren durch enzymatischen Verdau meistens schnell ihre Wirksamkeit, wenn diese lokal injiziert werden (Ko et al., 2013). Deshalb ist es wichtig, die Faktoren in einem Scaffoldmaterial zu integrieren bzw. miteinander zu kombinieren, um sie einerseits vor schneller Degradation zu schützen und andererseits kontrolliert freizusetzen. Eine langanhaltende und kontinuierliche Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Chemokinen aus dem Scaffold kann die Mobilisierung und Differenzierung von Gewebespezifischen Stammzellen oder Vorläuferzellen fördern und die Regeneration in funktionsfähiges Gewebe regulieren (Kaully et al., 2009; Chen et al., 2011; Ko et al., 2012; Ko et al., 2013).

Anforderungen an ein Drug Delivery-System für das *in situ* Tissue Engineering

Wachstumsfaktoren und Chemokine sollten als effektive Therapeutika lokal und ausreichend lange ihre optimale Wirkung entfalten. Bei einer direkten Injektion (in Lösung und meist in großer Menge, auch Bolus-Injektion genannt) von Wachstumsfaktoren in den zu regenerie-

renden Defekt diffundieren die Faktoren schnell in das umliegende Gewebe, werden enzymatisch abgebaut und deaktiviert oder können bei übermäßiger Konzentration die gewünschte Wirkung überschreiten, welches insgesamt zu einem Ausbleiben der gewünschten Zellantwort führt (Tabata, 2003; Lee et al., 2007; Yao et al., 2008; Chen et al., 2010a; Novosel et al., 2011; Mehta et al., 2012; Vo et al., 2012; Ko et al., 2013). Deshalb wurden und werden Drug Delivery-Systeme entwickelt, um die Wirkung von Wachstumsfaktoren im Körper effizienter (lokal und langanhaltend) zu gestalten. Ein optimales Trägersystem sollte fünf Funktionen erfüllen: 1) lokale Freisetzung des Wachstumsfaktors im Defektbereich, 2) Schutz vor frühzeitigem enzymatischem Abbau, 3) länger anhaltende Freisetzung einer physiologisch relevanten Konzentration, 4) Förderung der Zellantwort (Adhäsion, Proliferation, Differenzierung und Migration) und 5) Degradierbarkeit des Trägersystems für eine vollständige Geweberegeneration (Tabata, 2003; Pakulska et al., 2012; Vo et al., 2012). Bietet die Kombination aus Scaffoldmaterial beladen mit Wachstumsfaktoren und Chemokinen ein geeignetes Mikroumfeld (wie Porenstruktur des Materials und Signalmoleküle) für die Zellen, proliferieren diese, differenzieren sich z.B. zu Osteoblasten und sezernieren weitere Signalmoleküle, um weitere Zelltypen anzulocken oder zu aktivieren, damit der Prozess der Regeneration in Knochengewebe beschleunigt wird (Kneser et al., 2006; Chen et al., 2011; Ko et al., 2013; Vanden Berg-Foels, 2014).

Bindung von Wachstumsfaktoren und Chemokinen

Es gibt verschiedene Drug Delivery-Strategien, bei denen Wachstumsfaktoren oder Chemokine in das Trägermaterial integriert oder damit kombiniert werden. Faktoren können (1) direkt mit einem Polymer (darunter zählen auch Hydrogele) vermischt werden (Sheridan et al., 2000; Biondi et al., 2008) oder (2) durch Einschluss, in z.B. Alginatbeads, in ein Polymer integriert werden (Nochos et al., 2008). Weitere Ansätze sind (3) die Beschichtung eines Scaffolds mit einem Wirkstoff-enthaltenden Polymers (Wolf-Brandstetter et al., 2006) oder die Kombination (4) mit Wachstumsfaktor-bindenden Proteinen wie Heparin (Wissink et al., 2001; Lode et al., 2008). Diese Strategien beruhen auf nicht-kovalenten Bindungen, die einerseits spezifisch, d.h. über Bindungsmotive (hohe Bindungsaffinität), oder andererseits unspezifisch über ionische Wechselwirkungen (geringere Bindungsaffinität) erfolgen können. Des Weiteren kann ein Faktor kovalent immobilisiert (durch chemische Konjugation) oder physikalisch in das Material eingeschlossen werden. Die Auswahl der richtigen Strategie ist u.a. abhängig von physikochemischen Eigenschaften des eingesetzten Faktors und Interaktionen zwischen Faktor und Trägermaterial (Chen et al., 2010a; Mehta et al., 2012; Vo et al., 2012; Ko et al., 2013). Durch die Abbaurate des Trägers, die zur Beladung verwendete Porteinmenge, Proteindiffusion, Partikelgröße und ggf. den Vernetzungsgrad werden

maßgeblich die Freisetzungskinetiken des eingesetzten Wachstumsfaktors aus den Trägersystemen bestimmt (Vo et al., 2012).

Drug Delivery-Systeme – Kollagen

Aufgrund der Vielzahl von unterschiedlichen Wirkstofffreisetzungssystemen und Trägermaterialien soll im Folgenden nur auf das Material Kollagen, die Modifizierung mit Heparin und die Verwendung von Hydrogelkomponenten eingegangen werden, da diese Komponenten in der Arbeit zur Anwendung kamen.

Die Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus Kollagen-Matrices wird generell durch die Diffusionsrate der Komponenten durch die gequollene Matrix, aber auch durch Matrixinteraktionen und enzymatischen Abbau bestimmt (Uebersax et al., 2009; Vo et al., 2012). Allerdings eignen sich Kollagen-Matrices (wie getrocknete Kollagenfilme oder viskose Kollagengele (Rubin et al., 1973) und Kollagenschwämme (Jorgensen et al., 1991)) aufgrund einer hohen initialen Freisetzung und einer geringen Ladungskapazität nicht für eine gezielte und langanhaltende Wachstumsfaktorfreisetzung (Fujioka et al., 1998; Lee et al., 2007). Verschiedene Techniken müssen zur Anwendung kommen, damit Kollagen als ein geeignetes Trägermaterial für eine kontrollierte Freisetzung von Wachstumsfaktoren genutzt werden kann (Fujioka et al., 1998). Durch die kovalente Bindung von Wachstumsfaktoren wie BMP und VEGF an primäre Aminogruppen der Materialoberfläche mit Hilfe von N-Hydroxysuccinimid/ N-Ethyl-(dimethylaminopropyl)carbodiimid (NHS/EDC) oder N-N-Carbonyldiimidazol konnte die Wirkstofffreisetzung verlangsamt werden (Lee et al., 2007; Stamov et al., 2008; Kaully et al., 2009; Uebersax et al., 2009; Vo et al., 2012).

Drug Delivery-Systeme – Heparin

Heparin ist ein Wachstumsfaktor-bindendes Polysaccharid (Capila und Linhardt, 2002), welches sich hervorragend für ein kontrolliertes Freisetzungssystem eignet (Tae et al., 2006). Heparin gehört zu den Glykosaminoglykanen und wird von Mastzellen im Bindegewebe produziert. Es ist ein hoch sulfatiertes, anionisches Polysaccharid (Mehrfachzucker) aus sich wiederholenden Disaccharid-Einheiten (Zweifachzuckern) (Abbildung 7). Das strukturverwandte Heparansulfat (ein Proteoglykan) kommt in der extrazellulären Matrix des Menschen vor und ist wie Heparin an vielen physiologischen Prozessen beteiligt (Capila und Linhardt, 2002; Irie et al., 2007).

Heparin hat die höchste negative Ladungsdichte biologischer Makromoleküle, dadurch vermittelt es eine wichtige biologische Rolle als multivalentes Bindungsmolekül für zahlreiche Proteine (Tae et al., 2006; Nie et al., 2007; Irie et al., 2007). Die Bindungen erfolgen über elektrostatische Interaktionen zwischen N- und O-sulfatierten Resten des Heparins und den Lysin- und Arginin-Resten der Wachstumsfaktoren (Elia et al., 2010). So bindet es zahlreiche

Adhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktoren (wie VEGF und FGF), um sie gegen thermische Denaturierung und enzymatische Degradation zu schützen, ihre Bioaktivität beizubehalten und ihre Bindung an Rezeptoren (z.B. Antithrombin III, Vermittlung im Thromboseprozess) zu verstärken (Capila und Linhardt, 2002; Tae et al., 2006; Nie et al., 2007; Uebersax et al., 2009; Elia et al., 2010). Eine Strategie um die Einsprossung von Blutgefäßen in poröse Scaffolds zu fördern ist deren Modifizierung mit Heparin. Durch die spezifische Bindung von angiogenen Faktoren wie VEGF an Heparin kann die Vaskularisierung eines Scaffoldmaterials *in vitro* und *in vivo* gefördert werden. In Studien von (Singh et al., 2011) konnte eine beschleunigte Blutgefäßbildung mit Hilfe eines mit Heparin-beschichteten PCL-Scaffolds, beladen mit VEGF, erzielt werden. Auch eine demineralisierte Knochenmatrix, funktionalisiert mit Heparin und beladen mit VEGF, förderte die Einsprossung von Blutgefäßen (*in vivo*) in das Scaffold (Chen et al., 2010b).

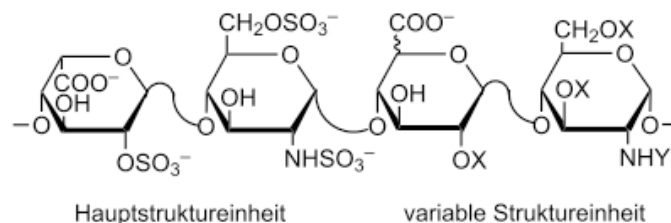


Abbildung 7: Chemische Struktur von Heparin (verändert nach Capila und Linhardt, 2002)

Drug Delivery-Systeme – Hydrogele

Eine alternative Drug Delivery-Strategie ist der Einsatz von Hydrogelen oder eine Scaffold-Modifizierung, bei der poröse Scaffolds mit bioaktiven Polymeren oder Hydrogelen beschichtet werden. Hierbei werden Wachstumsfaktoren und Chemokine physikalisch eingeschlossen oder können direkt beim Herstellungsprozess mit in das Scaffold eingearbeitet werden, um Zellfunktionen, wie die osteogene Differenzierung oder den Vorgang der Einsprossung von Blutgefäßen, zu steuern (Vo et al., 2012). Hydrogele sind physikalisch oder chemisch vernetzte Polymere mit einem Wasseranteil von mehr als 90%. Es sind sehr biokompatible Materialien, die bei Geweberegenerationstrategien häufig zur Anwendung kommen. Aufgrund ihrer porösen und wasserbindenden Natur eignen sich Hydrogele besonders gut für die Aufnahme von Wirkstoffen und deren Freisetzung, welche von der Wasseraufnahme, dem Abbau des Hydrogels und der Diffusionsrate durch die Hydrogelmatrix abhängt. Allerdings birgt der hohe Wasseranteil auch einen entscheidenden Nachteil, da hydrophile Wirkstoffe wie Proteine sehr löslich sind und aus dem Gel innerhalb von wenigen Stunden oder Tagen herausdiffundieren können. Die Freisetzungskinetik ist meistens durch eine hohe initiale Freisetzung des Faktors, mit anschließender langsamer Freisetzung durch Diffusion durch das Hydrogel gekennzeichnet. Strategien, um eine konstante und langanhaltende Wirkstoff-

freisetzung zu ermöglichen, sind eine ionische, physikalische (z.B. UV-Bestrahlung) oder kovalente Vernetzung (mit Chemikalien wie Glutaraldehyd) der Hydrogelmatrix bzw. die kovalente Anbindung von Wirkstoffen über Bindungsmoleküle an die Matrix (Mehta et al., 2012; Pakulska et al., 2012; Vo et al., 2012).

Neben dem natürlichen Polymer Alginat können u.a. auch Chitosan, Fibrin, Hyaluronsäure, Kollagen oder Methylcellulose als Drug Delivery-System verwendet werden, welche in der nachfolgenden Tabelle dargestellt sind.

Tabelle 2: Verschiedene Biopolymere zur Anwendung als Hydrogel in Drug Delivery-Systemen (Sohier et al., 2008; Van Tomme et al., 2008; Pakulska et al., 2012; Alvarez-Lorenzo et al., 2013; Gasperini et al., 2014; Kim et al., 2014; Madry et al., 2014)

Biopolymer	Stoffklasse	Chemische Zusammensetzung	Vernetzung/Gelbildung	Quelle
Alginat	Polysaccharid	D-Mannuronsäure und L-Glucuronsäure	ionische Vernetzung	Braunalgen und Seetang
Cellulose	Polysaccharid	D-Glucose	thermische/chemische Vernetzung	Zellwände höherer Pflanzen
Chitosan	Polysaccharid	D-Glucosamin und N-Acetyl-Glucosamin	physikalische oder chemische (z.B. Glutaraldehyd) Vernetzung	Chitin aus Exoskelett von Krebstieren und Insekten, Chitosan aus Zellwänden von Pilzen
Fibrin	Protein	Aminosäuren	enzymatische Polymerisation	Blut
Hyaluronsäure	Polysaccharid	D-Glucuronsäure und D-Glucosamin	thermische/chemische Vernetzung durch Modifizierung	Extrazelluläre Matrix von verschiedenen Geweben (höheren Tieren)
Kollagen	Protein	Aminosäuren (hauptsächlich Glycin und Prolin)	thermische/pH-abhängige Vernetzung	Extrazelluläre Matrix von verschiedenen Geweben

Alginate werden klinisch angewendet (z.B. als Wundauflagenmaterial) (Bidarra et al., 2014) und wurden bereits häufig als Scaffoldmaterialien für das Tissue Engineering und als Trägermaterial für Wirkstoffe getestet (Downs et al., 1992; Peters et al., 1998; Elcin et al., 2001; Rabbany et al., 2010; Bidarra et al., 2014). Der Vorteil des Alginates liegt in der einfachen und biokompatiblen Vernetzung der Alginatstränge durch zweiwertige Kationen wie Ca^{2+} , Sr^{2+} und Ba^{2+} (Draget et al., 1997; Uebersax et al., 2009; Bidarra et al., 2014).

Alginatehydrogele schützen eingeschlossene Wachstumsfaktoren vor enzymatischem Abbau. Allerdings ist die Degradation im menschlichen System unspezifisch und die Freisetzung wird hauptsächlich durch Diffusion bestimmt. Um eine hohe initiale Freisetzung eines Wachstumsfaktors zu unterdrücken, zeigte sich die Mischung mit anderen Polysacchariden wie Heparin (Tanihara et al., 2001) als wirkungsvoll, damit eine lang anhaltende Freisetzung und damit auch ein positiver Effekt bei der Zellantwort erzielt werden konnte (Lee et al., 2007; Nie et al., 2007; Uebersax et al., 2009). Neben Alginat wird Hyaluronsäure oft im Tissue Engineering verwendet, weil es im Gegensatz zu Alginat im menschlichen Körper in der extrazellulären Matrix des Bindegewebes vorkommt. Es spielt in verschiedenen zellulären Prozessen, wie der Proliferation, Entzündung und Wundheilung eine Rolle. Als Hydrogel kann Hyaluronsäure alleine nicht verwendet werden, da es durch das Enzym Hyaluronidase im Körper schnell abgebaut wird (Pardue et al., 2008; Pakulska et al., 2012). Versuche, Hyaluronsäure als passives oder aktives Drug Delivery-System von Wachstumsfaktoren zu verwenden, sind an eine chemische Vernetzung bzw. Modifizierung der Struktur oder die Verwendung von Bindungsmolekülen gekoppelt (Shu et al., 2004; Nimmo et al., 2011).

Zu dem in dieser Arbeit verfolgten Ansatz, bei welchem ein VEGF-haltiges Depot in Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen injiziert wird, um die VEGF-Freisetzung und den Effekt des freigesetzten VEGF auf die Proliferation von Endothelzellen und die Migration in das Innere des Scaffolds zu untersuchen, wurde in der Literatur keine vergleichbare Studie gefunden.

1.4 Trägermaterial – Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen

Einführung – Kollagen Typ I und Hydroxylapatit

Die Zusammensetzung und die poröse Struktur der in dieser Arbeit verwendeten Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen kommt jener der extrazellulären Matrix des Knochengewebes sehr nah und eignet sich deshalb sehr gut als Knochenersatzmaterial (Cui et al., 2007; Cen et al., 2008; Gelinsky et al., 2008; Meyer et al., 2009). Generell sind natürliche Polymere wie das Kollagen Typ I von großem Interesse für das Tissue Engineering (Kanczler und Oreffo, 2008). Neben der Möglichkeit des Abbaus im Körper und der Biokompatibilität von Kollagen (Chevallay und Herbage, 2000; Domaschke et al., 2006; Glowacki und Mizuno, 2008; Kanczler und Oreffo, 2008; Al-Munajjed und O'Brien, 2009; Ruozzi et al., 2009), welche die Adhäsion, Proliferation und Differenzierung von Zellen unterstützt, besitzt es noch zahlreiche weitere Vorteile. Durch enzymatische Abspaltung der Telozeptidregionen (mit Pepsin) kann sog. Atelokollagen erzeugt werden, das nur schwach immunogen ist (Chevallay und Herbage, 2000; Glowacki und Mizuno, 2008). Des Weiteren besitzt es RGD-Sequenzen

(bestehend aus den Aminosäuren Arginin-Glycin-Aspartat), welche eine spezifische Zelladhäsion durch Interaktion mit Integrinen unterstützen. Kollagen besitzt verschiedene geladene und polare Gruppen, wodurch sich Moleküle und Proteine leicht an der Struktur anheften können und somit die Zelladhäsion gefördert wird (Cui et al., 2007; Meyer et al., 2009). Kollagenfibrillen weisen viskoelastische Eigenschaften mit einer hohen Zugfestigkeit auf und die faserartige Struktur des Kollagens erleichtert das Einwachsen von Zellen (Currey, 2002; Cui et al., 2007; Dendorfer et al., 2008). Durch diese vorteilhaften Merkmale und das unbegrenzte natürliche Vorkommen wird Kollagen bereits seit vielen Jahren als Scaffoldmaterial erforscht und für medizinische Anwendungen (u.a. Hautregeneration und Knorpelheilung) eingesetzt (Chevallay und Herbage, 2000; Cui et al., 2007; Al-Munajjed und O'Brien, 2009). Eine Kombination von Calciumphosphaten (wie Hydroxylapatit) und Kollagen vereint die hohe Druckfestigkeit der Mineralphase und die hohe Zugfestigkeit des Kollagens (Cen et al., 2008; Dendorfer et al., 2008; Harley et al., 2009; Al-Munajjed und O'Brien, 2009). Allerdings weisen poröse Kollagenscaffolds (ohne Mineralphase) aufgrund des geringen Kompressionsmoduls ungenügende mechanische Eigenschaften für Last-tragende Anwendungen im Knochengewebeersatz auf (Currey, 2002; Dendorfer et al., 2008; Glowacki und Mizuno, 2008; Meyer et al., 2009; Al-Munajjed und O'Brien, 2009). Auch eine Steigerung der mechanischen Eigenschaften durch Quervernetzung der Kollagenstruktur reicht für dieses Anwendungsgebiet nicht aus (Chevallay und Herbage, 2000; Al-Munajjed und O'Brien, 2009).

In dieser Arbeit verwendete Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen

In dieser Arbeit wurde der biomimetische Ansatz der synchronen Mineralisation und Reassemblierung von Kollagenfibrillen nach Bradt et al. (1999) genutzt. Es gibt noch weitere Ansätze zur Herstellung eines Kompositmaterials vom einfachen Zusammenmischen der Komponenten (Meyer et al., 2009), über die Beschichtung von Kollagen mit Hydroxylapatit (z.B. durch das Eintauchen von Kollagenscaffolds in eine Natrium-Ammoniumhydrogenphosphatlösung und anschließend in eine Calciumchlorid-Lösung (Al-Munajjed und O'Brien, 2009)) oder die Mineralisation von Kollagen durch ein duales Membrandiffusionssystem unter Verwendung einer Kollagen-, Kationen- und Anionenlösung (Zhao et al., 2010). Ausgehend von Kollagenmonomeren, Calcium- und Phosphationen findet im Prozess nach Bradt die Selbstassemblierung der Kollagenfibrillen bei einer Temperatur von 37°C und einem pH-Wert von 7,4 statt, wobei die Fibrillen als Template für die gleichzeitige Calciumphosphatkristallisation dienen. Hierbei entsteht ein Nanokompositmaterial, das aus ca. 30% Kollagen und 70% nanokristallinem Hydroxylapatit besteht. Aus diesem Material wurden membranartige 2D- und poröse 3D-Scaffolds entwickelt (Burth et al., 1999; Gelinsky et al., 2008). Wie in dieser Arbeit durchgeführt, wird bei der Herstellung von 3D-Scaffolds eine konzentrierte mineralisierte Kollagensuspension gefriergetrocknet, um eine poröse Struktur zu erhalten. Anschließend wird

die Struktur mit dem Carbodiimid EDC vernetzt. Die so entstandenen Poren haben einen Durchmesser von durchschnittlich 180 µm und sind interkonnektierend (Gelinsky et al., 2008). Somit ist die Struktur für eine Zellbesiedlung des Scaffoldmaterials und eine Einwanderung der Zellen *in vitro* geeignet. In verschiedenen *in vitro*-Studien konnte die sehr gute Biokompatibilität des mineralisierten Kollagens gezeigt werden (Domaschke et al., 2006; Lode et al., 2008; Bernhardt et al., 2009b; König et al., 2014). So konnte die erfolgreiche Proliferation von humanen MSC, wie auch deren Differenzierung zu Osteoblasten auf diesem Material festgestellt werden. Des Weiteren zeigte eine *in vivo*-Studie (Yokoyama et al., 2005) auch die Biokompatibilität des Materials.

2 Zielstellung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit sollte die Etablierung von neuen Drug Delivery-Strategien zur Lösung des Problems der fehlenden Vaskularisierung bei größeren Zell-Matrix-Konstrukten *in vivo* sein. Dazu sollten 3D-Scaffoldmaterialien aus hoch, porösem mineralisiertem Kollagen mit dem angiogenen Wachstumsfaktor VEGF funktionalisiert werden, um dessen Freisetzungskinetik anzupassen. Im Sinne des *in situ* Tissue Engineering soll dieses neuartige System (ohne vorherige Zellbesiedlung) nach der Implantation die Regeneration von größeren Knochendefekten – ausgelöst durch Traumata (speziell bei Vorliegen einer Osteoporose) oder Tumore – unterstützen. Es sollten hierzu zwei verschiedene Strategien für eine gerichtete Freisetzung aus dem Scaffoldmaterial entwickelt werden.

Um eine effektive Wirkung des Wachstumsfaktors VEGF zu erzielen, sollte die Freisetzungskinetik von einer geringen initialen, gefolgt von einer konstanten und langanhaltenden Freisetzung geprägt sein. Zum einen wird durch den angiogenen Faktor die Einprossung von Blutgefäßen in das Scaffoldmaterial gefördert und zum anderen dient er auch als Chemoattraktant, um u.a. Endothelzellen aus dem umliegenden Gewebe anzulocken.

Allerdings genügte das mineralisierte Kollagen als Biomaterial allein den Anforderungen einer langanhaltenden Freisetzung nicht, da der Wachstumsfaktor durch die poröse Struktur und wenig Interaktion mit dem Material schnell herausdiffundiert.

Eine Strategie, um das Freisetzungsverhalten zu verbessern, sollte die Modifizierung des gesamten Scaffoldmaterials mit dem Polysaccharid Heparin sein. Hierbei konnte auf Vorarbeiten von Frau Dr. Ulla König aufgebaut werden. Heparin soll den eingesetzten Wachstumsfaktor binden und verzögert freisetzen, um die Vaskularisierung des Materials zu unterstützen. Darüber hinaus kann Heparin weitere Proteine aus dem Medium *in vitro* bzw. Blut *in vivo* binden und so die Signalwirkung auf Zellen verstärken.

Die Beladung der Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen mit einem zentralen Wirkstoffdepot sollte die zweite Strategie darstellen. Durch die lokale Injizierung eines Wirkstoffdepots aus verschiedenen Komponenten wie dem Hydrogel Alginate sollte der Effekt auf die Freisetzung anhand des Wachstumsfaktors VEGF untersucht und eine kontrollierbare und langanhaltende Freisetzung erzielt werden. Damit sollte ein Wirkstoffgradient im Inneren des Scaffold entstehen, um Zellen durch Chemotaxis ins Innere des Scaffolds zu locken und somit die Vaskularisierung gefördert werden. Insgesamt sollte nach einer möglichen Implantation des mit einem VEGF-haltigen Depot beladenen Scaffolds damit eine schnellere Defektheilung im Knochen eintreten, indem Endothelzellen, aber auch mesenchymale Stammzellen gezielt in das Scaffold migrieren, so dass das Scaffoldmaterial effektiver besiedelt, vaskularisiert und dann in natürliches Gewebe umgebaut werden kann.

3 Material und Methoden

Im folgenden Abschnitt werden die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und durchgeführten Methoden zur Herstellung von Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen und deren Funktionalisierung mit verschiedenen Wirkstoffen sowie zur Charakterisierung der funktionalisierten Scaffolds beschrieben.

3.1 Feinchemikalien, Medien, Lösungen

Die anschließenden Tabellen beinhalten die Feinchemikalien, Zellkulturmedien/Zusätze und verschiedenen Kit-Systeme, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Alle Grundchemikalien wurden von den Firmen Merck, Roth und Sigma Aldrich bezogen.

Tabelle 3: Feinchemikalien und Materialien

Feinchemikalien/Materialien	Hersteller
Alginat-Natriumsalz (Manugel DMB)	ISP Capitel Inc., Wilmington, USA
BSA (bovines Serumalbumin)	Sigma Aldrich
Diethanolamin	Merck
EDC (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride)	Fluka
Ethanol (absolut 99,6%)	Roth
Glycin	Roth
<i>Hanks Balanced Salt Solution</i>	Sigma Aldrich
Heparin-Natriumsalz	Sigma Aldrich
Hyaluronsäure-Natriumsalz (aus <i>Streptococcus equi</i> sp.)	Fluka
Leitsilber	Plano GmbH, Wetzlar
Lösliches Kollagen Typ I aus Rindersehnen (lyophilisiert)	Syntacoll GmbH, Saal
MES (2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure)	Roth
Methylcellulose (Methocel™, mittlere Viskosität)	Fluka
PBS	Life technologies, Darmstadt
Triton® X-100	Sigma Aldrich
Tween 20	Sigma Aldrich

Tabelle 4: Nachweisreagenzien, Enzyme und Wachstumsfaktoren

Nachweisreagenzien, Enzyme und Wachstumsfaktoren	Hersteller
Alcianblau 8 GS	AppliChem
Anti-VEGF-Antikörper (<i>Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Antibody Produced in Goat IgG</i>)	Sigma Aldrich
Chlorzinkjodid	Roth
DMMB (1,9-Dimethylmethylenblau)	Sigma Aldrich

FITC-VEGF-A ₁₆₅	MorphoPlant GmbH, Bochum
Humaner VEGF 165-Antikörper (<i>human VEGF 165 Biotinylated Affinity Purified PAb, Goat IgG</i>)	R&D Systems
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)	Sigma Aldrich
Papain	Sigma Aldrich
Pepsin	Merck
p-Nitrophenylphosphat	Sigma Aldrich
rHuVEGF-A ₁₆₅ (rekombinanter humaner vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor A165)	MorphoPlant GmbH, Bochum
Streptavidin-HRP (<i>streptavidin horseradish peroxidase</i>)	R&D Systems
TMB (3, 3',5',5'-Tetramethylbenzidine)	Sigma Aldrich

Tabelle 5: Zellkulturmedien und Zusätze

Zellkulturmedium/Zusätze	Hersteller
Medien	
α-MEM	Biochrom AG
Endothelial Cell Basalmedium MV	Promocell GmbH
Endothelial Cell Growth Medium MV	Promocell GmbH
Zellkulturreagenzien und Zusätze	
AAP	Sigma Aldrich
Dex	Sigma Aldrich
FCS	Biochrom AG
L-Glutamin	Biochrom AG
Pen/Strep	Biochrom AG
βGP	Sigma Aldrich
Trypsin Neutralizing Solution	Lonza GmbH
Trypsin/EDTA	Biochrom AG

Tabelle 6: Kit-Systeme

Kits	Hersteller
CytoTox 96 [®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	Promega, Mannheim
Quant-iT [™] PicoGreen [®] dsDNA reagent	Life technologies

3.2 3D-Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen

Tabelle 7: Lösungen/Puffer und Enzyme für die Kollagenherstellung

Lösung/Puffer und Enzyme	Zusammensetzung
CaCl ₂ -Lösung (0,1 M)	11,10 g CaCl ₂ in 1 l deionisiertem H ₂ O

EDC-Lösung	2 Gew.-% N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid hydrochlorid in 80%igem Ethanol
Glycin-Lösung	1 Gew.-% Glycin in deionisiertem H ₂ O
HCl-Lösung (0,1 M)	100 ml HCl (1 M) in 900 ml deionisiertem H ₂ O
HCl-Lösung (1 M)	1 M HCl-Maßlösung
MES-Puffer (50 mM)	9,76 g 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure in deionisiertem H ₂ O
NaCl-Lösung (2 M)	116,88 g NaCl in 1 l deionisiertem H ₂ O
Pepsin (10 FIP-U/mg)	68 mg Pepsin in 3,16 mM HCl
Phosphatpuffer (0,5 M) nach Sørensen pH 7,4	+ 9,32 g K ₂ HPO ₄ ×3H ₂ O + 1,24 g KH ₂ PO ₄ in 100 ml deionisiertem H ₂ O
TRIS-Puffer (0,5 M) pH 7,5	+ 60,57 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) in 966,3 ml deionisiertem H ₂ O + 33,7 ml 37%iger HCl

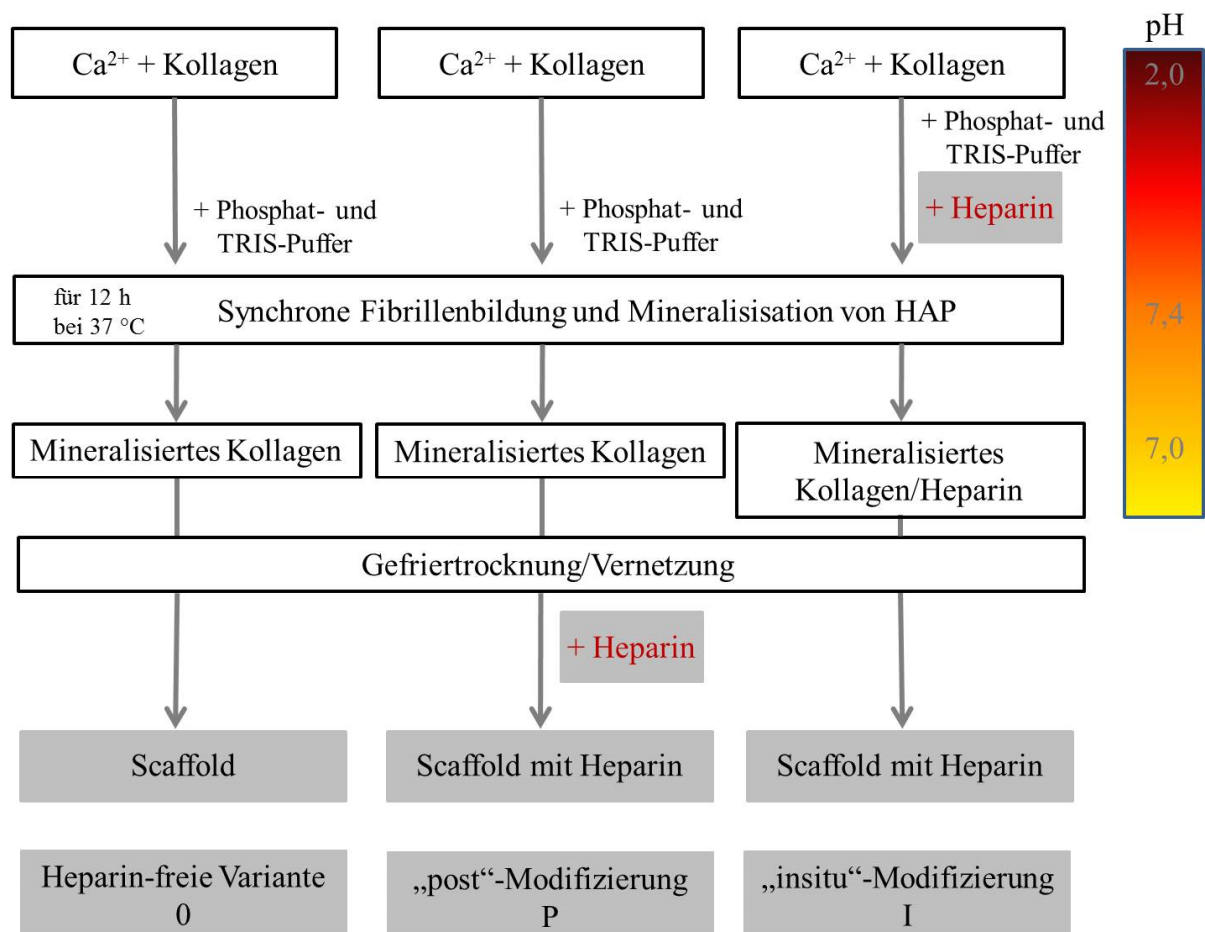


Abbildung 8: Synchrone Fibrillen-Reassemblierung und -Mineralisierung mit HAP

3.2.1 Aufbereitung des Kollagens

Für die Herstellung der Scaffolds wurde gefriergetrocknetes bovines Kollagen Typ I von der Firma Syntacoll (Saal an der Donau) verwendet. 3,41 g des Kollagens wurden in 568 ml deionisiertes Wasser überführt und unter Zugabe von 4 ml 1 M HCl mit einem Ultra Turrax® zerkleinert. Nach 10 min wurde der pH-Wert mit 1 M HCl auf 2,47 eingestellt. Anschließend wurde Pepsin für den Kollagenverdau hinzugegeben (für einen üblichen 4500 ml Ansatz mit 27 g Kollagen wurden 270 mg Pepsin eingesetzt). Der Ansatz wurde für 72 h mit 80 rpm (Rührgerät Heidolph RZR 2021) bei RT gerührt. Danach wurde die Lösung auf 11°C gekühlt und mit einer 3%igen Wasserstoffperoxid-Lösung (15 g pro 4500 g Ansatz) konserviert. Aus dieser Lösung wurden 10 g entnommen und daraus der Feststoffgehalt des Kollagens mittels Gefriertrocknung bestimmt, welcher in einem Bereich von 0,58 bis 0,64 Gew.-% lag. Diese Stammlösung war bei 4°C für ca. 3 Monate lagerfähig.

3.2.2 Synchrone Fibrillenbildung und Mineralisierung

Mit Hilfe des biomimetischen Prinzips der synchronen Kollagen-Fibrillierung und -Mineralisierung nach (Bradt et al., 1999) konnte aus der Kollagen-Stammlösung ein Nanokomposit aus Kollagen und Mineral (HAP) hergestellt werden. Um 1 g mineralisiertes Kollagen (Trockengewicht) herzustellen, wurde ein Gesamtvolumen von 2 l benötigt. Zunächst wurden 160 bis 180 g der Kollagenstammlösung (mit einer Konzentration von ca. 0,6%) in 0,1 M HCl unter Rühren gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von 180 ml 0,1 M CaCl_2 , 120 ml 2 M NaCl zur Einstellung der Ionenstärke, sowie 168 ml TRIS- und 22,6 ml Phosphatpuffer (je 0,5 M) zur Einstellung des pH-Wertes auf 7,4. Die neutral gepufferte Lösung wurde für 12 h bei 37°C inkubiert. Unter diesen Bedingungen erfolgte der Prozess der simultanen Reassemblierung der Kollagenfibrillen und der Bildung eines nanokristallinen Hydroxylapatit (HAP)-Präzipitates, welches zu einem homogenen Nanokompositmaterial aus ca. 30 Gew.-% Kollagen und 70 Gew.-% HAP (Bradt et al., 1999) führte.

3.2.3 3D-Scaffold-Herstellung

Das Nanokompositmaterial aus Kollagen und HAP wurde mittels Zentrifugation gewonnen und das Pellet in deionisiertem Wasser resuspendiert (1 mg mineralisiertes Kollagen/0,625 ml dH_2O). Um Scaffolds mit einer Größe von 6 mm im Durchmesser und 3 bzw. 8 mm in der Höhe herzustellen, wurde die Kollagen/Mineral-Suspension in die Kavitäten einer Zellkulturplatte mit 96 Wells gefüllt. Anschließend wurde die befüllte Platte bei -20°C für mind. 6 h eingefroren und das Kollagen/Mineral-Komposit gefriertrocknet. Hierbei wurde der Gefriertrockner Christ ALPHA 1-2 (Fa. Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH) auf ca. -40°C heruntergekühlt, die Proben in die Kammer gestellt und ein Vakuum von 0,34 mbar angelegt. Die so erhaltenen

zylindrischen porösen 3D-Scaffolds wurden mit einer 2% EDC-Lösung (in 80% Ethanol) für 1,5 h vernetzt, mehrmals mit Wasser gespült, danach in einer 1% Glycin-Lösung inkubiert und wieder mit Wasser gespült. Danach wurden die Scaffolds erneut gefriergetrocknet (Gelinsky et al., 2008). Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen werden als Heparin-freie Variante („0“) (siehe Abbildung 8 linke Säule) bezeichnet.

3.3 Heparin-Modifizierung der Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen

Bei der Modifizierung der Scaffolds (6 mm im Durchmesser und 3 mm hoch) mit Heparin wurden zwei Ansätze verfolgt (Abbildung 8), die im Folgenden näher beschrieben werden. Hergestellte Scaffolds (modifiziert mit Heparin und Heparin-frei) wurden danach mit Gammastrahlung von 25 kGy sterilisiert.

3.3.1 „insitu“-Modifizierung

Bei der „insitu“-Modifizierung wird Heparin **vor** dem Prozess der simultanen Fibrillenbildung und Mineralisation zugegeben (siehe Abbildung 8 rechte Säule). Heparin (mit Konzentrationen von 30, 75 und 150 mg Heparin/g min. Koll.) wurde in 10 ml deionisiertem Wasser für ca. 10 min auf einem Schüttler gelöst. Danach wurde die Heparin-Lösung dem Ansatz zur Herstellung von mineralisiertem Kollagen zugefügt. Erst anschließend wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und der Ansatz über Nacht bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert. Die synchrone Fibrillierung und Mineralisierung fand somit in Gegenwart von Heparin („in situ“) statt. Die in dieser Arbeit verwendete Bezeichnung der „insitu“-modifizierten Proben ist in Tabelle 8 aufgeführt.

3.3.2 „post“-Modifizierung

Die „post“-Modifizierung wurde **nach** der Herstellung der Scaffolds durchgeführt (siehe Abbildung 8 mittlere Säule). Hierbei wurden die gefriergetrockneten Scaffolds eines gesamten Ansatzes (ca. 200 Stück mit einem Durchmesser von 6 mm und einer Höhe von 3 mm) in ein Becherglas überführt und in 50 mM MES-Puffer mit verschiedenen Heparinkonzentrationen (30, 75 und 150 mg Heparin/g min. Koll.; für Vorversuche wurden außerdem Konzentrationen von 200, 250, 300, 400 und 800 mg Heparin/g min. Koll. verwendet) für 24 h bei RT unter leichtem Schütteln (20 rpm) inkubiert. Danach wurden die Scaffolds je 30 min mit 50 mM MES-Puffer (1 Mal) und mit deionisiertem Wasser (3 Mal) gewaschen. Die Scaffolds wurden bei -20°C eingefroren und danach gefriergetrocknet. In Tabelle 8 sind die unterschiedlichen Heparin-Modifikationen, die eingesetzten Heparinkonzentrationen und die dazugehörigen Bezeichnungen dargestellt.

Tabelle 8: Probenbezeichnung der Heparin-modifizierten Scaffolds

Bezeichnung	Heparin-Modifizierung	Heparinkonzentration [mg Heparin/g min. Koll.]
0	Heparin-freie Variante	-
I-30	„insitu“-Modifizierung	30
I-75	„insitu“-Modifizierung	75
I-150	„insitu“-Modifizierung	150
P-30	„post“-Modifizierung	30
P-75	„post“-Modifizierung	75
P-150	„post“-Modifizierung	150

3.4 Funktionalisierung mit Hydrogelen zur Integration eines zentralen Wirkstoffdepots

Zur Etablierung eines Wirkstoffgradienten innerhalb eines Scaffolds wurden verschiedene Biopolymer-Hydrogele in Kombination mit dem Wachstumsfaktor VEGF in mineralisierte Kollagenscaffolds injiziert.

3.4.1 Komponenten der Wirkstoff-Depots

Um ein Wirkstoffdepot zu erzeugen, wurden verschiedene Komponenten wie Heparin, Alginat, Hyaluronsäure und Methylcellulose und Kombinationen aus diesen Biopolymeren verwendet (Tabelle 9).

Tabelle 9: Zusammensetzung der Wirkstoffdepots

Material	Zusammensetzung	Molekulargewicht	Sterilisation
Heparin	1 mg/ml in deionisiertem Wasser	6-12 kDa	Sterilfiltration durch einen 0,22 µm Membranfilter
1% Alginat	1 g Alginat in 100 ml deionisiertem Wasser	10-150 kDa (je nach Herstellung (Bidarra et al., 2014))	Autoklavieren des Pulvers
1% Hyaluronsäure	1 g Hyaluronsäure in 100 ml deionisiertem Wasser	150-180 kDa	Autoklavieren des Pulvers

1% Methylcellulose	1 g Methylcellulose in 100 ml deionisiertem Wasser	20-60 kDa bei einer Viskosität von 1500 mPaxs (2%, 20°C)	Autoklavieren des Pulvers
1% Alginat + Heparin	1 g Alginat in 100 ml deionisiertem Wasser mit 1 mg Heparin/ml	-	Autoklavieren des Alginat-Pulvers und Sterilfiltration der Heparin-Lösung
1% Alginat + 1% Hyaluronsäure	1 g Alginat + 1 g Hyaluronsäure in 100 ml deionisiertem Wasser	-	Autoklavieren eines Alginat/Hyaluronsäuregemisches als Pulver
1% Alginat + 1% Methylcellulose	1 g Alginat + 1 g Methylcellulose in 100 ml deionisiertem Wasser	-	Autoklavieren eines Alginat/Methylcellulosegemisches als Pulver

3.4.2 Injizierung der Wirkstoffdepots in Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen

Unter sterilen Bedingungen wurden die Hydrogelkomponenten in sterile Scaffolds (6 mm im Durchmesser und 8 mm hoch) aus mineralisiertem Kollagen mit Hilfe einer modifizierten Multipipette injiziert (siehe Abbildung 9). Das Volumen der Lösungen entsprach 15 µl und war durch die Multipipette exakt einstellbar. Die so funktionalisierten Scaffolds wurden in Zellkulturmedium, die Varianten mit Alginat zuvor noch für 10 min in 0,1 M CaCl₂-Lösung eingelegt. Durch die zweiwertigen Calcium-Ionen werden Alginatmoleküle vernetzt.

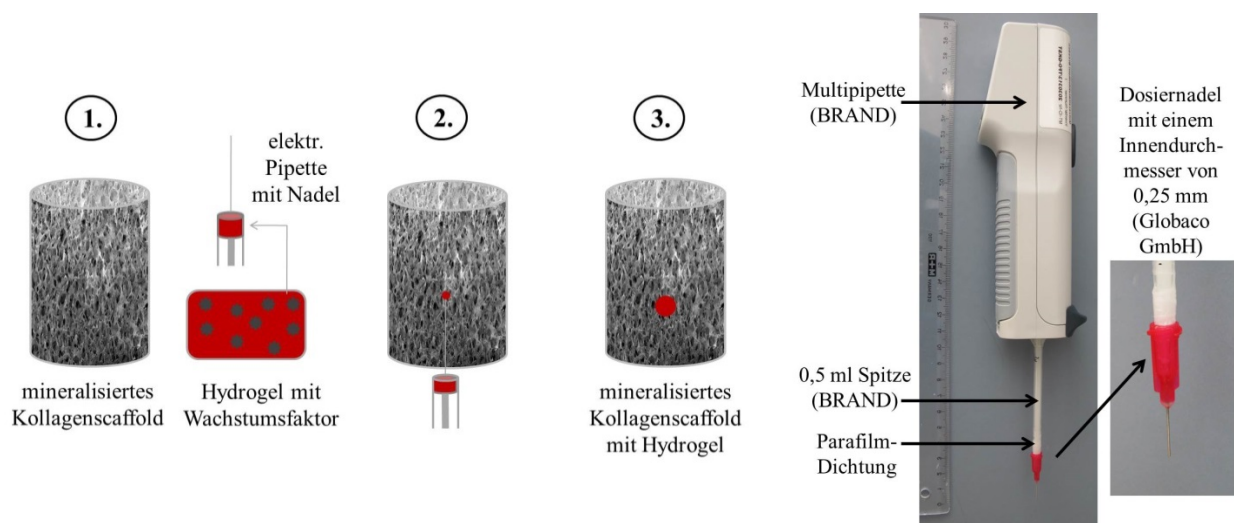


Abbildung 9: Schematische Abbildung der Funktionalisierung von mineralisierten Kollagenscaffolds mit einem zentralen Hydrogelwirkstoffdepot und Darstellung der modifizierten Multipipette zur Injizierung eines Wirkstoffdepots

3.5 Materialcharakterisierung

3.5.1 Nachweis des gebundenen bzw. integrierten Heparins im Scaffold

Heparin-modifizierte Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen wurden mit Hilfe von Dimethylmethylenblau (DMMB) zur Anfärbung und Quantifizierung des Heparins im Scaffold untersucht. DMMB ist ein kationischer Farbstoff, welcher mit negativ geladenen sulfatierten Gruppen von Proteoglykanen einen Komplex bildet. Dieser kann durch die Änderung in der Absorption bei einer Wellenlänge von 525 – 535 nm quantifiziert werden (Dey et al., 1992).

Tabelle 10: Lösungen zum Nachweis von Heparin

Lösungen	Zusammensetzung
DMMB-Arbeitslösung	16 mg 1,9-Dimethylmethylenblau + 5 ml 99,6% Ethanol + 3 ml konzentrierte Ameisensäure + 26,5 ml 1 M NaOH auf 1 l mit doppelt destilliertem H ₂ O auffüllen
Papain-Lösung	10 mg Papain in 100 ml 1x <i>Hanks Balanced Salt Solution</i>

Quantitativer Nachweis (DMMB-Methode)

Für die Quantifizierung des gebundenen Heparins wurden die Scaffolds zerkleinert, das Kollagen verdaut und in der entstandenen Suspension der Heparin Gehalt ermittelt.

Jeweils ein Scaffold wurde in ein spezielles 2,0 ml Reaktionsgefäß (Peglab Biotechnologie GmbH, Erlangen) mit 5 Keramikkügelchen (mit einem Durchmesser von 1,4 mm, Peglab) überführt. Die Scaffolds wurden danach bei 5900 rpm für 2 Mal 10 s zerkleinert (Precellys® 24, Peglab). Um das Heparin aus dem Scaffold freizusetzen, wurde 1 ml einer Papain-Lösung hinzugegeben, kräftig geschüttelt und für 24 h bei 60°C in einem Wärmeschrank inkubiert. Bei 60°C denaturiert die Kollagenhelix und Papain bewirkt den Verdau der Proteinketten.

Für die Messung des Heparin Gehaltes wurden 100 µl der Suspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 1250 µl der DMMB-Arbeitslösung hinzugegeben (Wolf-Brandstetter et al., 2006). Die Proben wurden kurz geschüttelt, für 15 min bei RT inkubiert und anschließend für 15 min bei 10.000 g zentrifugiert. 300 µl des Überstandes wurden in eine 96 Well-Mikrotiterplatte pipettiert und mit Hilfe eines Mikroplatten-Readers (infinite M200 PRO, Tecan, Männedorf, Schweiz) die Absorption bei 590 nm gemessen. Zur Berechnung des Heparin Gehaltes diente eine Heparin-Standard-Lösung (1 mg/ml). Mit Hilfe des Gewichts der Scaffolds und den erhaltenen Daten konnte die am Scaffold gebundene Heparin-Menge ermittelt werden. Dazu wurde das Gesamtgewicht der Scaffolds eines Ansatzes durch das Gewicht des einzelnen Scaffolds, für den der Heparin Gehalt bestimmt wurde, geteilt und mit dem gemessenen Wert multipliziert.

Optischer Nachweis

Die Scaffolds wurden in eine 24 Well-Zellkulturplatte überführt und 2 ml der DMMB-Arbeitslösung hinzugefügt. Anschließend wurden die Scaffolds schüttelnd für 10 min bei RT inkubiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und die Scaffolds mit Wasser gespült. Um den inneren Bereich des Scaffolds anzufärben, wurden die bereits gefärbten Scaffolds mit einer handelsüblichen Rasierklinge halbiert und erneut mit 2 ml DMMB-Arbeitslösung für 10 min inkubiert.

Die gefärbten Scaffolds wurden mit Hilfe eines Stereomikroskops (Leica M205C; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) untersucht und anhand der Intensität der Färbungen und deren Verteilung im Scaffold miteinander verglichen.

3.5.2 Nachweis der injizierten Depot-Komponenten in den Scaffolds

Die Depotkomponenten wurden ohne Wirkstoff, wie unter 3.4.2 beschrieben, in Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen injiziert. Anschließend wurden die Scaffolds mit injiziertem Alginat oder Komponenten in Kombination mit Alginat für 10 min in 0,1 M CaCl_2 und danach in Freisetzungsmedium inkubiert, während injizierte Komponenten ohne Alginat direkt in Freisetzungsmedium inkubiert wurden. Das Medium wurde zuerst nach 2 h, dann alle 24 h und nach Tag 7 3 Mal pro Woche gewechselt. Anschließend wurden die Scaffolds bei -80°C eingefroren. Zum Analysezeitpunkt wurden die Scaffolds aufgetaut, mit einer handelsüblichen Rasierklinge halbiert und die Hälften in eine 24 Well-Zellkulturplatte überführt.

Tabelle 11: Färbelösungen zum Detektieren der Hydrogelkomponenten

Färbelösung	Zusammensetzung
DMMB	
DMMB-Arbeitslösung	16 mg DMMB + 5 ml Ethanol (99,6%) + 3 ml Ameisensäure (98%) + 26,5 ml NaOH (1 M) auf 1 l mit deionisiertem H_2O auffüllen
Alcianblau	
Alcianblau-Arbeitslösung	60 ml Ethanol (99,6%) + 40 ml Essigsäure (100%) + 10 mg Alcianblau 8 GS
Entfärbelösung	120 ml Ethanol (99,6%) + 80 ml Essigsäure (100%)
Chlorzinkjodid	
Chlorzinkjodid-Arbeitslösung	Chlorzinkjod-Lösung nach Behrens (Fertiglösung), für die Mikroskopie

Nachweis von Heparin und Alginat mit DMMB

Mittels der DMMB-Arbeitslösung konnte vor allem Heparin, aber auch Alginat in den Scaffolds nachgewiesen werden. Hierfür wurden die Scaffolds mit 1,5 ml der DMMB-Arbeitslösung für 10 min schüttelnd inkubiert und anschließend mit destilliertem Wasser mehrmals gewaschen. Die optische Auswertung erfolgte mit einem Stereomikroskop (Leica M205C).

Nachweis von Hyaluronsäure mit Alcianblau

Wie mit DMMB lassen sich Proteoglykane auch mit Alcianblau anfärben (Barbosa, 2003). 1,5 ml der Alcianblau-Arbeitslösung wurde auf die Scaffolds gegeben und für 24 h inkubiert. Danach wurde überschüssiges Alcianblau durch eine Entfärbelösung von den Scaffolds entfernt. Die optische Auswertung erfolgte mit einem Stereomikroskop (Leica M205C).

Nachweis von Methylcellulose mit Chlorzinkjodid

Methylcellulose wurde mit Hilfe des Färbereagens Chlorzinkjodid dunkelbraun angefärbt (Jefferys et al., 1953). Die Scaffolds wurden für 10 min mit 1,5 ml der Chlorzinkjodid-Arbeitslösung schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Scaffolds mehrmals mit destilliertem Wasser gespült und mittels eines Stereomikroskops (Leica M205C) untersucht.

3.5.3 Rasterelektronenmikroskopie zur Bestimmung der Porenmorphologie

Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie (REM) konnte die Porenstruktur der Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen untersucht werden. Gefriergetrocknete Scaffoldschnitte wurden auf Aluminiumpins fixiert, mit Leitsilber abgeleitet und mit Gold beschichtet (Sputter Coater SCD 050, Balzers). Die Proben wurden mit einem XL 30 ESEM-FEG (Phillips) bei einer Beschleunigungsspannung von 1 kV im REM-Modus analysiert.

3.5.4 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurde angewendet, um die Struktur der Scaffolds, vor allem die gebildeten Mineralkristalle und deren Anordnung, im Nanometerbereich zu veranschaulichen. Dazu wurden gefriergetrocknete Scaffolds in kleine Stücke (2 × 2 mm) zerlegt und mit purem Epoxidharz infiltriert. Anschließend wurden die Proben bei 60°C für 72 h polymerisiert. Nach dem Herstellen einer glatten Schnittfläche (EM-TRIM 2; Leica) wurden Ultradünnschnitte (70 nm Dicke) am Ultramikrotom (Leica UC6) mittels Diamantmesser (Fa. Diatome) angefertigt und auf 300er Mesh Kupfergrits mit Kohlelochfilm (Fa. Quantifoil) aufgebracht. Die Ultradünnschnitte wurden mit einem TEM (Tecnai 10, Firma FEI, USA) bei 100 kV Beschleunigungsspannung analysiert.

Die Probenpräparation wurde freundlicherweise von Dr. Armin Springer und die TEM-Analysen von Dr. Paul Simon (Max-Planck-Institut für Chemische Physik fester Stoffe, Dresden) durchgeführt.

3.5.5 Bestimmung des Mineralgehaltes (Glühverlust)

Die hergestellten Scaffolds bestehen aus einem Nanokompositmaterial, dessen organischer Teil aus Kollagen und anorganischer Anteil aus Hydroxylapatit besteht. Um den Mineralgehalt der Scaffolds zu bestimmen, wurden diese zunächst für 1 h bei 120°C getrocknet und anschließend gewogen. Danach wurde der organische Anteil der Scaffolds bei 1000°C für 1 h in einem Muffelofen (Nabertherm P330) verglüht. Der Rückstand wurde gewogen und aus der Differenz beider Massen (vor und nach dem Verglühen) der Anteil an organischer/anorganischer Substanz bestimmt.

3.5.6 Bestimmung von mechanischen Kenngrößen

Es wurden sowohl die elastischen Eigenschaften (Elastizitätsmodul) als auch die Kompressionseigenschaften (Druckfestigkeit bei 20%-iger Kompression) bestimmt. Scaffolds mit einer Höhe von 10 mm und einem Durchmesser von 6 mm wurden hierfür verwendet.

Die Druckversuche wurden freundlicherweise von Dr.-Ing. Birgit Paul durchgeführt.

Elastizitätsmodul und Druckspannung

Für die Messung wurden die zylindrischen Proben einerseits für 24 h in SBF (*simulated body fluid*, Tabelle 12) gelagert, und im feuchten Zustand als auch nach der Gefriertrocknung (im trockenen Zustand) verwendet. Die Prüfung erfolgte mittels einer Kraftprüfmaschine (Modell 5566, Fa. Instron) und einer 100 N Kraftmessdose bei einer Prüfgeschwindigkeit von 1 mm/min durch Kompression parallel zur Zylinderachse. Der Elastizitätsmodul wurde aus der mechanischen Spannung und der Dehnung (bzw. Kompression) der Probe im linearen Elastizitätsbereich berechnet (siehe Formel 1).

Formel 1: Elastizitätsmodul

$$E = \frac{\Delta\sigma}{\Delta\varepsilon}$$

E – Elastizitätsmodul
 σ – Dehnung
 ε – Spannung

Als Druckfestigkeit wurde die Druckspannung bei einer Kompression von 20% verwendet.

Tabelle 12: Zusammensetzung der verwendeten SBF

Material	Zusammensetzung
SBF (<i>simulated body fluid</i>)	300 ml deionisiertes H ₂ O + 2,702 g NaCl + 0,252 g NaHCO ₃ + 0,2118 g Na ₂ CO ₃ + 0,113 g KCl + 0,115g KH ₂ PO ₄ × 3H ₂ O + 0,156 g MgCl ₂ × 6H ₂ O + 0,147 g CaCl ₂ + 0,036 g Na ₂ SO ₄ + 8,946 g HEPES in 50 ml NaOH lösen und dazugeben auf pH 7,4 bei 36,5°C mit 1 M NaOH einstellen und mit deionisiertem H ₂ O auf 0,5 l auffüllen

3.6 Beladung der Scaffolds mit dem Wirkstoff VEGF

VEGF wurde in dieser Arbeit als Modellsubstanz verwendet, um die Freisetzung eines chemoattraktiven Wachstumsfaktors aus modifizierten Scaffolds, dessen Verteilung innerhalb der Scaffolds und die stimulierende Wirkung auf Endothelzellen untersuchen zu können.

Tabelle 13: Lösungen bzw. Medien zur Beladung mit VEGF und Untersuchung der Freisetzung

Lösungen/Medien	Zusammensetzung
Freisetzungsmedium	Endothelial Cell Basalmedium MV + 0,9% Pen/Strep (100 U/ml Penicillin/ 100 µg/ml Streptomycin) + 15% hitzeinaktiviertes FCS (Charge 194X)
PBS/BSA	1% bovines Serumalbumin in PBS

3.6.1 Homogene Beladung der gesamten Scaffolds

Bei der homogenen Beladung mit VEGF wurden sterile Heparin-freie („0“) und Heparin-modifizierte („insitu“ und „post“; 30, 75 und 150 mg Heparin/g min. Koll.) Scaffolds verwendet. Zunächst wurden 48 Well-Zellkulturplatten mit PBS/BSA über Nacht beschichtet, damit der Wachstumsfaktor nicht an die Oberfläche der Zellkulturplatte bindet. Anschließend wurden die Scaffolds mit einem Durchmesser von 6 mm und einer Höhe von 3 mm in die Platte überführt und mit 30 µl einer Lösung aus 200 ng VEGF in PBS/BSA beträufelt, so dass das Volumen von der porösen Struktur komplett aufgesogen wurde. Die Scaffolds wurden für 12 h bei 37°C und

5% CO₂ inkubiert. Danach wurden die Scaffolds mit 500 µl Freisetzungsmedium gespült, für 5 min auf dem Schüttler bei 100 rpm inkubiert und das Medium in 1,7 ml *low-binding* Reaktionsgefäße überführt (siehe Abbildung 10). Der Spülvorgang wurde 3 Mal durchgeführt. Die gesammelte Spüllösung diente später zur Bestimmung des ungebundenen VEGF-Anteils (siehe 3.7). Die beladenen Scaffolds wurden anschließend für den nächsten Zeitpunkt in Freisetzungsmedium überführt.

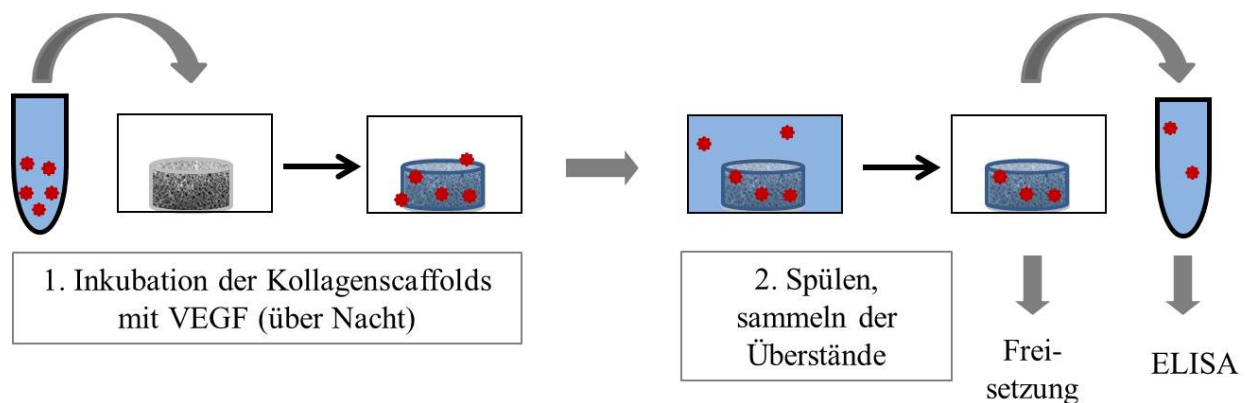


Abbildung 10: Homogene Beladung von 3D-Scaffolds mit VEGF

3.6.2 Beladung der Scaffolds mit einem zentralen VEGF-haltigen Depot

Bei der Beladung mit Hilfe eines VEGF-haltigen Depots wurden nicht-modifizierte Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen verwendet. Zunächst wurden 24 Well-Zellkulturplatten mit PBS/BSA über Nacht beschichtet. Die verwendeten Scaffolds hatten einen Durchmesser von 6 mm und eine Höhe von 8 mm. Anschließend wurden 11 µl der Depotkomponente mit 4 µl einer VEGF-Lösung (400 ng in PBS (100 µg/ml)) vermischt und ein Gesamtvolumen von 15 µl in eine Scaffoldtiefe von 6 mm wie in Abbildung 9 dargestellt injiziert (siehe 3.4.2). Bei den Varianten mit Alginat wurden die Scaffolds danach zunächst für 10 min in 0,1 M CaCl₂ und anschließend in Freisetzungsmedium inkubiert.

3.6.3 Freisetzung aus VEGF-beladenen Scaffolds

Um die VEGF-Freisetzungskinetik aus den unterschiedlich beladenen Scaffolds zu untersuchen, wurden die homogen beladenen Scaffolds über die Versuchsdauer in 1 ml Freisetzungsmedium und Scaffolds mit einem VEGF-haltigem Depot aufgrund ihrer Größe in 1,5 ml Freisetzungsmedium inkubiert. Dieses wurde zuerst nach 2 h, dann alle 24 h gewechselt. Die Überstände wurden entweder frisch für die sich anschließende Analyse verwendet oder bei -80°C eingefroren. Neben der Bestimmung der VEGF-Konzentration mittels ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) in den Überständen wurde die biologische Aktivität des freigesetzten VEGF in Endothelzell-Proliferationsexperimenten getestet (siehe Abbildung 11).

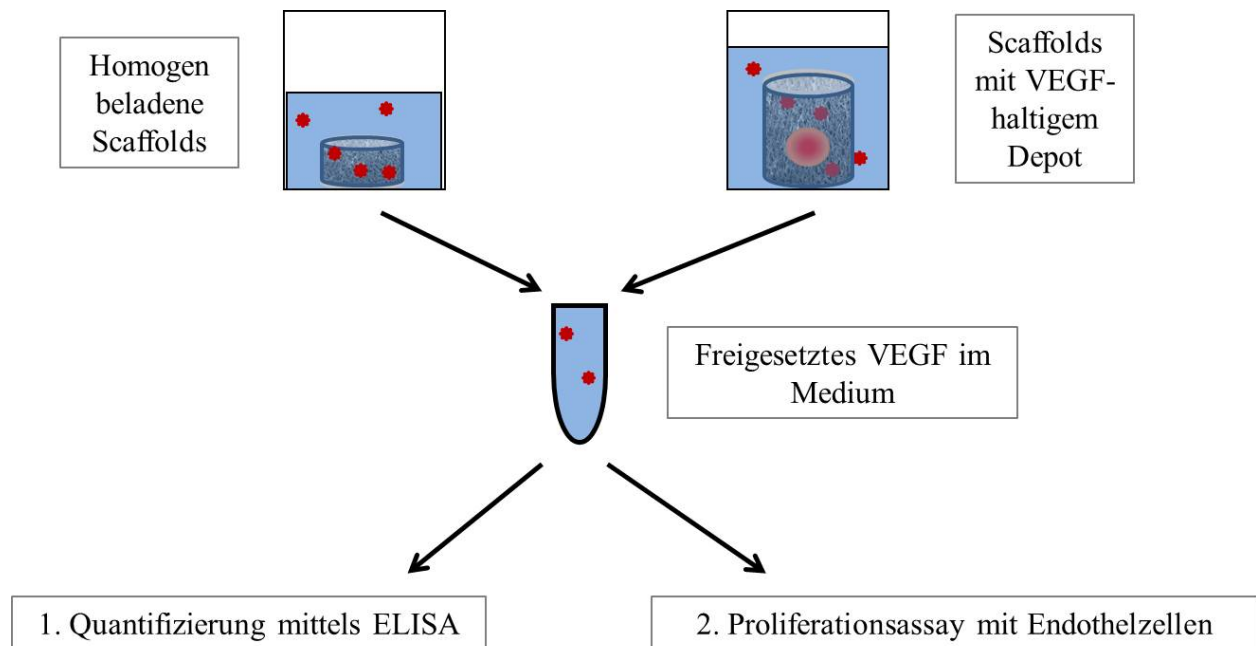


Abbildung 11: VEGF-Freisetzung aus den verschiedenen beladenen Scaffolds und anschließende Analyse

3.6.4 Nachweis eines Wirkstoffgradienten innerhalb von Scaffolds mit einem zentralen VEGF-haltigen Depot

Für die Untersuchung der Verteilung von VEGF innerhalb eines Scaffolds mit zentralem Depot wurde Fluorescein-markiertes VEGF (FITC-VEGF-A₁₆₅) verwendet. Scaffolds mit einem Durchmesser von 6 mm und einer Höhe von 8 mm wurden mit einem Depot beladen, welches in eine Scaffoldtiefe von 6 mm wie unter 3.4.2 beschrieben injiziert wurde. Die beladenen Scaffolds wurden in Freisetzungsmedium unter Zellkulturbedingungen inkubiert, welches zuerst nach 24 h, dann alle 48 h gewechselt wurde. Die Zellkulturplatte wurde mit Aluminiumfolie umwickelt, um ein Ausbleichen des Farbstoffes während der Versuchsdauer zu verhindern. Nach 10 min, 24 h, 3 und 7 d wurden die Scaffolds entnommen und mit einer handelsüblichen Rasierklinge in zwei Hälften geteilt. Danach wurden die Scaffoldhälften in eine spezielle Plastikschiene (35 mm Durchmesser, ibidi GmbH) überführt und die Verteilung des FITC-VEGF im Scaffold mittels konfokalem Laser-Scanning Mikroskop (cLSM, Zeiss LSM 510) analysiert, wobei der Fluoreszenzfarbstoff bei einer Wellenlänge von 458 nm angeregt wurde.

3.7 Bestimmung der VEGF-Konzentration

Die Konzentration des freigesetzten Faktors im Medium und in einer Standard-Lösung wurde mittels ELISA quantifiziert. Dazu wurden die zu analysierenden Proben für den Test aufgetaut. Gemäß der Arbeitsvorschrift (siehe Tabelle 15) wurde eine 96 Well-Maxisorb-Platte mit dem 1. Antikörper (AK) beschichtet. Nach der Inkubation über Nacht wurden freie Bindungsstellen mit BSA blockiert. Danach wurden die Überstände mit VEGF (ggf. Verdünnungen) in die Wells

pipettiert, damit VEGF am 1. AK binden kann. Ein 2. biotinylierter AK koppelt wiederum am gebundenen VEGF. Im nächsten Schritt bindet ein mit dem Enzym Meerrettichperoxidase gekoppeltes Streptavidin am 2. AK. Mit Hilfe eines Substrates wird dieses durch das Enzym Meerrettichperoxidase umgesetzt und das Produkt kann in einem blauen Farbumschlag bei einer Wellenlänge von 405 nm mit einem Mikroplatten-Reader (infinite M200 PRO, Tecan) detektiert werden. Die VEGF-Konzentration konnte später anhand eines Standards im Bereich von 78 pg/ml bis 5 ng/ml, welcher auf jeder Platte mitgeführt wurde, berechnet werden.

Tabelle 14: Lösungen und Antikörper für die ELISAs

Lösung/Antikörper	Zusammensetzung/ Konzentration
Blockpuffer	1% BSA + 5% <i>Sucrose</i> in PBS
Stopplösung	2 N H ₂ SO ₄ (Schwefelsäure)
Streptavidin-HRP	Verdünnung 1:200
Substratlösung	TMB (3, 3',5 ,5'-Tetramethylbenzidine liquid substrate, supersensitive)
Verdünnungspuffer	1% BSA in PBS
Waschpuffer	0,05% Tween 20 in PBS
<i>Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Antibody Produced in Goat IgG (1. AK)</i>	1 mg/ml in PBS
<i>Human VEGF 165 Biotinylated Affinity Purified PAb, Goat IgG (2. AK)</i>	1 mg/ml in 1% BSA in PBS

Tabelle 15: Arbeitsvorschrift zur Durchführung des ELISA

Arbeitsschritt	Reagenzien	Inkubationszeit
Inkubation mit 1. AK	100 µl AK-Lösung 1:1000 in PBS	ca. 12 h
Waschen	400 µl Waschpuffer	3 min
Blockieren	300 µl Blockpuffer	1 h
Waschen	400 µl Waschpuffer	3 min
- Inkubation der Probe	100 µl des Überstandes, ggf. in Verdünnung mit Verdünnungspuffer	2 h
- Zugabe des Standards	5 ng in 1 ml Verdünnungspuffer, anschließend Verdünnungsgreihe (1:2) bis 78 pg/ml	

Waschen	400 µl Waschpuffer	3 min
Inkubation mit 2. AK	100 µl AK-Lösung 1:200 in Verdünnungspuffer	2 h
Waschen	400 µl Waschpuffer	3 min
Inkubation mit Streptavidin-HRP	100 µl Lösung 1:200 in Verdünnungspuffer	20 min
Waschen	400 µl Waschpuffer	3 min
Zugabe der Substratlösung	100 µl	2-3 min
Zugabe der Stopplösung	50 µl	
Messen der Absorption bei 450 nm		

3.8 Zellen

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC)

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Proliferation und osteogenen Differenzierung (siehe 3.8.1) wurden hMSC eines gesunden Spenders (interne Bezeichnung 40), welche aus dem Knochenmark isoliert wurden, verwendet. Diese wurden von Prof. Bornhäuser (Medizinische Klinik I, Universitätsklinikum „Carl Gustav Carus“ an der TU Dresden) zur Verfügung gestellt. In den Versuchen wurden Zellen der Passage 4 und 5 verwendet.

hMSC wurden in flüssigem Stickstoff gelagert. Für die Kultivierung wurden die Zellen in Proliferationsmedium in einer T175-Zellkulturflasche bis zu einer Konfluenz von ca. 80% expandiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank. Danach wurde das Medium entfernt und die Zellschicht mit PBS gespült. Die adhärenenten Zellen wurden mit Hilfe von Trypsin/EDTA vom Flaschenboden abgelöst. Um die Aktivität des Trypsins zu stoppen, wurde Proliferationsmedium dazugegeben. Die Zellen in der Lösung wurden bei 1500 rpm für 5 min zu einem dichten Zellpellet zentrifugiert und in Proliferationsmedium resuspendiert. Mit Hilfe eines Zellzählgerätes (Scepter[™] 2.0 Cell Counter; Millipore) wurde die Zellzahl bestimmt. Die Zellausbeute lag je nach Spender bei ca. 3,0 bis 4,0 × 10⁶ Zellen pro T175-Zellkulturflasche.

Neben der Kultivierung der Zellen in Proliferationsmedium als Wachstumsmedium erfolgte die Stimulation zur osteogenen Differenzierung durch Zugabe von osteogenen Supplementen im Medium (Differenzierungsmedium).

Tabelle 16: Zellkulturmedien und Mediumsbestandteile für hMSC

Medium/Lösung	Zusammensetzung
Proliferationsmedium	α -MEM + 9% FCS (Charge: 194X) + 0,9% Pen/Strep + 0,9% L-Glutamin
Differenzierungsmedium	α -MEM + 9% FCS (Charge: 194X) + 10^{-8} M Dex + 5 mM β GP + 0,05 mM AAP + 0,9% Pen/Strep + 0,9% L-Glutamin
PBS w/o Ca/Mg (pH 7,4)	8,00 g/l NaCl + 0,20 g/l KCl + 1,15 g/l Na_2HPO_4 + 0,20 g/l KH_2PO_4 in deionisiertem H_2O
Trypsin/EDTA	0,05% Trypsin/0,02% EDTA in deionisiertem Wasser

Für die Zellkultur wurden Zellkulturflaschen und verschiedene Wellplatten von den Firmen Nunc (Wiesbaden), TPP (Trasadingen, Schweiz) und ThermoScientific (Schwerte) verwendet.

Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMEC)

HDMEC wurden in den Passagen 5 bis 8 für Migrations- und Proliferationsexperimente (siehe 3.8.2 und 3.8.3) verwendet. Die Zellen wurden von der PromoCell GmbH (Heidelberg) bezogen. HDMEC wurden in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in EC (Endothelial Cell)-Wachstumsmedium in einer T75-Zellkulturflasche bis zu einer Konfluenz von 80-90%. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank. Vor dem Ablösen der Zellen mit 4 ml Trypsin/EDTA wurde die adhärenzte Zellschicht mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA für 2-3 min bei RT abgelöst. Diese Reaktion wurde nach der Inkubationszeit mit 4 ml Trypsininhibitor abgestoppt. Die Zellsuspension wurde bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml vorgewärmtem Wachstumsmedium resuspendiert. Mit Hilfe eines Zellzählgerätes (Scepter™) wurde die Zellzahl bestimmt.

Tabelle 17: Zellkulturmedien und Mediumsbestandteile für HDMEC

Medium/Lösung	Zusammensetzung/Bezeichnung
EC-Wachstumsmedium	+ Endothelial Cell Growth Medium MV + 0,9% Pen/Strep
Trypsininhibitor	Trypsin Neutralizing Solution

3.8.1 Osteogene Differenzierung von hMSC

Vorbereitung der Scaffolds

Es wurden für die Versuche Heparin-freie Scaffold („0“) und solche, modifiziert mit Heparin („post“ und „insitu“) mit einer Größe von 3 mm Höhe und 6 mm im Durchmesser verwendet. Zur Vorbereitung für den Zellversuch wurden die Scaffolds in Proliferationsmedium unter Zellkulturbedingungen für 24 h eingelegt, damit Proteine für eine bessere Zellanheftung am Scaffold binden konnten und das Scaffold gequollen und mit Flüssigkeit vollgesogen ist. Durch kurzes Auflegen der Scaffolds auf ein steriles Filterpapier wurde das Medium aus den Poren entfernt. Danach wurden die Scaffolds in eine 48 Well-Zellkulturplatte überführt.

Zellbesiedlung

Die Scaffolds wurden jeweils mit 5×10^4 hMSC besiedelt. Hierfür wurden 35 μ l einer Zellsuspension mit definierter Zellzahl vorsichtig auf die Scaffoldoberfläche getropft. Das Volumen war ausreichend, um die Poren des Scaffolds vollständig auszufüllen. Nach 45 min Adhäsionszeit im Inkubator wurden die Wells langsam mit 500 μ l Proliferationsmedium aufgefüllt, so dass die Proben bedeckt waren.

Kultivierung, Differenzierung und Probennahme

Die Kultivierung der Zell-besiedelten Scaffolds erfolgte in Proliferationsmedium. Am Tag 3 wurde ein Teil der Scaffolds weiter mit Proliferationsmedium und der andere Teil mit Differenzierungsmedium kultiviert. Hierbei wurde das jeweilige Medium alle 3 bzw. 4 Tage gewechselt. Die Probeentnahme erfolgte an Tag 1, 7, 14, 21 und 28. Die betreffenden Scaffolds wurden mit PBS gewaschen, in eine neue 48 Well-Zellkulturplatte überführt und für die spätere biochemische Analyse bei -80°C eingefroren.

3.8.2 Proliferationsexperimente mit HDMEC

In diesen Versuchen wurde die biologische Aktivität von VEGF, welches aus modifizierten Scaffolds freigesetzt wurde, getestet in dem untersucht wurde, ob VEGF die Proliferation von HDMEC stimuliert (siehe Abbildung 12).

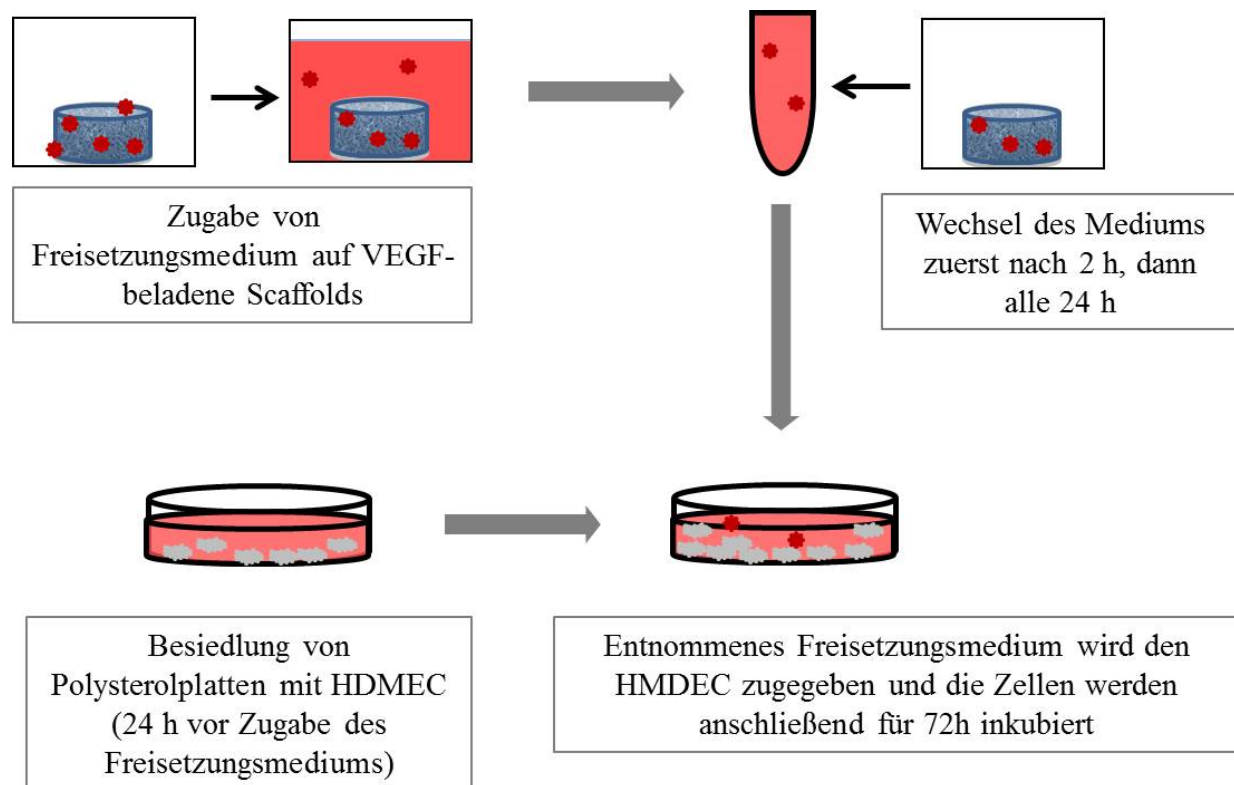


Abbildung 12: Schematische Darstellung eines Proliferationsexperimentes zur Testung der biologischen Aktivität des aus den Scaffolds freigesetzten VEGF

Vorbereitung – Material

Bei den Heparin-modifizierten Scaffolds wurde das Freisetzungsmedium (Überstand der Proben) (siehe 3.6.1) ohne vorheriges Einfrieren direkt für den Zellversuch verwendet. Die Überstände der Scaffolds mit einem Wirkstoffdepot (siehe 3.6.2) wurden bis zur Verwendung bei -80°C eingefroren.

Vorbereitung – Zellen

150 μl einer Zellsuspension mit 2×10^3 HDMEC wurden pro Well in 96 Well-Zellkulturplatten pipettiert und für 18 h in EC-Wachstumsmedium unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit VEGF kultiviert.

Kultivierung mit VEGF

Als erstes wurden die Zellen in den 96 Well-Zellkulturplatten mit Basalmedium gespült. Danach wurde das Freisetzungsmedium als Überstand von den Proben entnommen und mit Basal- und Zusatzmedium versetzt. Anschließend wurde es den Zellen zugeführt (siehe Tabelle 18), so dass die freigesetzte VEGF-Menge mit diesen zusätzlichen Medien 1:2 verdünnt war (siehe Tabelle 19). Zur Kontrolle der biologischen Aktivität des freigesetzten VEGF wurden Zellen mit verschiedenen VEGF-Konzentrationen (0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 17 und 20 ng/ml) in Zusatzmedium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO_2 für

72 h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Wells mit PBS gespült und die Zellen bei -80°C eingefroren. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels DNA-Quantifizierung (siehe 3.9.1).

Tabelle 18: Medien für die Proliferationsexperimente

Medien	Zusammensetzung
FreisetzungsmEDIUM	Siehe Tabelle 13
Basalmedium	Endothelial Cell Basalmedium MV + 0,9% Pen/Strep (100 µg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin)
EC-Wachstumsmedium	Siehe Tabelle 17
Zusatzmedium	74,5% Basalmedium + 22,5% hitzeinaktiviertes FCS (Charge: 194X) + 3% Heparin (1 mg/ml)

Tabelle 19: Pipettierschema zur Kultivierung mit VEGF

Verdünnungen	Volumen der Lösungen
Entspricht einer 1:2 Verdünnung des Freisetzungsmediums der Proben	25 µl Basalmedium + 75 µl Freisetzungsmedium + 50 µl Zusatzmedium

3.8.3 Migrationsexperimente mit HDMEC

Um die Migration von HDMEC in Richtung eines Wirkstoffgradienten zu untersuchen, wurde die Oberfläche von Kollagenscaffolds, die mit einem VEGF-Depot funktionalisiert wurden, oberflächlich mit Zellen besiedelt. Die Proben wurden danach unter Zellkulturbedingungen inkubiert und die Migration mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht (siehe Abbildung 13).

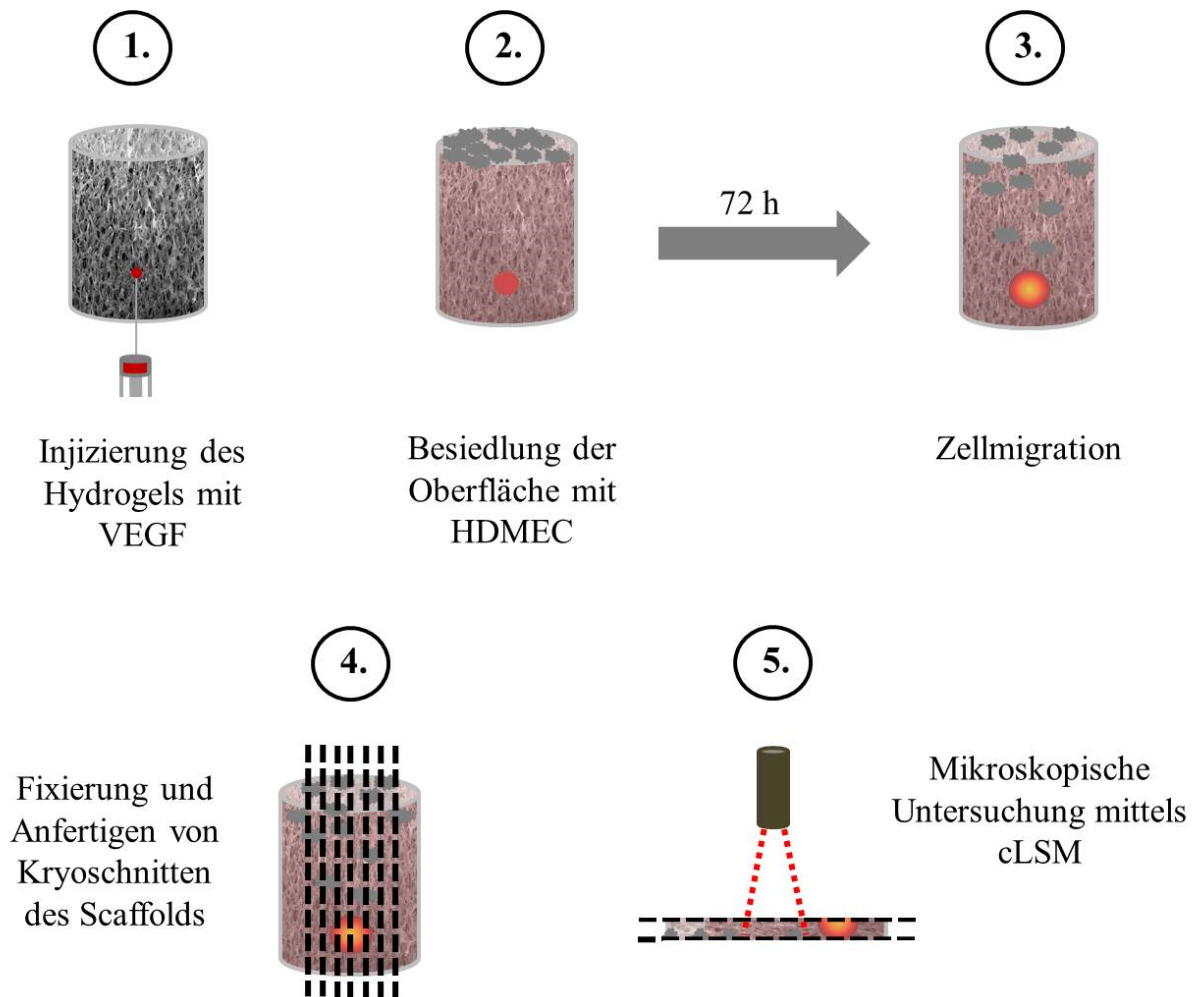


Abbildung 13: Schematischer Ablauf eines Zellmigrationsexperimentes

Vorbereitung der Scaffolds

Mineralisierte Kollagenscaffolds (6 mm im Durchmesser und 8 mm in der Höhe) wurden mit verschiedenen Komponenten und dem Wachstumsfaktor VEGF als Depot in einer Tiefe von ca. 6 mm beladen und in Medium überführt (siehe 3.4.1 und 3.4.2). Die Scaffolds mit Alginate als Hydrogelkomponente wurden zuerst für 10 min in 0,1 M CaCl_2 -Lösung, danach für 20 min in Basalmedium (siehe Tabelle 18) inkubiert. Die anderen Varianten wurden für 30 min nur in Basalmedium inkubiert.

Besiedlung der Scaffoldoberfläche mit HDMEC

Nach dem Absaugen des Mediums aus dem Well wurden vorsichtig auf die Oberfläche der vollgesogenen Scaffolds 10 μl einer Zellsuspension ($1-2 \times 10^5$ Zellen) getropft. Voraussetzung für den Versuch war die gleichmäßige Besiedlung der Oberfläche. Danach wurden die Zellen auf den Scaffolds für 45 min unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurden 2 ml Basalmedium hinzugegeben und für weitere 72 h inkubiert.

Färben und Schneiden der Proben

Die Scaffolds mit Zellen wurden mit PBS gespült und für mindestens 24 h in Formaldehyd (Fixierlösung) fixiert. Anschließend erfolgte die Anfärbung der Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff Höchst.

Zunächst wurden die Scaffolds mehrmals mit PBS gespült, danach mit Höchst-Farbstoff in PBS/BSA für 1 h im Dunkeln inkubiert. Nach mehrmaligem Spülen mit PBS wurden die Proben mit einer handelsüblichen Rasierklinge längs halbiert, in Kryoschälchen überführt und mit Einfriermedium aufgefüllt. Dann wurden die Scaffolds auf Trockeneis eingefroren.

Mit einem Kryotom (LeicaCM1900) wurden 40 µm dicke Längsschnitte bis zu einer Tiefe von ca. 500 µm (bezogen auf die bei der Halbierung der Scaffolds erzeugten Schnittfläche) angefertigt, auf einen Objektträger überführt und bei 37°C auf einer Heizplatte für ca. 12 h fixiert. Danach wurde Eindeckmedium zur besseren Visualisierung auf die Schnitte gegeben und mit einem Deckglas abgedeckt.

Die Kryoschnitte wurden freundlicherweise von Ashwini Rahul Akkineni angefertigt.

Tabelle 20: Farbstoffe, Medien und Materialien für die Probenpräparation

Farbstoffe/Medien/Materialien	Zusammensetzung/Bezeichnung	Hersteller
Höchst	Höchst, Trichlortrihydrat 100 mg/ml 1:5000 in PBS mit 1% BSA	invitrogen
Eindeckmedium	Roti [®] -Mount Fluor Care	Roth
Einfriermedium	NEG 50 [™] Richard-Allan Scientific	Thermo Scientific
Fixierlösung	4% neutral gepufferte Formaldehydlösung	VWR
Kryoschälchen	Tissue-Tek [®] Cryomold [®] 15 mm × 15 mm × 5 mm	Sakura
Objektträger	Superfrost Ultra Plus Menzel Gläser	Thermo Scientific

Analyse der Zellmigration

Die Kryoschnitte auf den Objektträgern wurden mit einem konfokalem Laser-Scanning Mikroskop (cLSM, Zeiss LSM 510) bei einer Anregungs-Wellenlänge von 405 nm analysiert. Der Längsschnitt wurde komplett abgerastert und so ein aus mehreren Bildern zusammengesetztes Bild aufgenommen. Mit Hilfe des Computerprogrammes Arivis Vision 4D (Version 2.10.1, Arivis AG, Rostock) wurden die Zellen der jeweiligen Schnittebenen ausgezählt.

3.9 Biochemische Analysemethoden

Die Bestimmung der Zellzahl zur Beurteilung der Proliferation der Zellen erfolgte indirekt durch die Messung der intrazellulären Lactatdehydrogenase (LDH) bzw. des DNA-Gehaltes im Zelllysat. Aufgrund der Bindung von DNA am Scaffoldmaterial wurde für die Zellzahlbestimmung bei den hMSC-besiedelten Scaffolds die LDH-Aktivität herangezogen. Bei den HDMEC (Proliferationsassay) wurde aufgrund geringer metabolischer Aktivität der DNA-Gehalt zur Zellzahlbestimmung genutzt. Die Bestimmung der osteogenen Differenzierung von hMSC erfolgte anhand der spezifischen Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP), ein charakteristisches Enzym für die osteogene Differenzierung. Alle Lösungen und Puffer zur biochemischen Analyse sind in Tabelle 21 aufgeführt.

Tabelle 21: Lösungen und Puffer für die biochemischen Analysemethoden

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung/Kit
Lyse	
Lysepuffer	1% Triton® X-100 in PBS
Bestimmung des DNA-Gehaltes	
1xTE-Puffer	1 M Tris-HCl (pH 8,0) 0,5 M EDTA (pH 8,0) in deionisiertem H ₂ O
PicoGreen-Färbelösung	Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA reagent Arbeitslösung: 1 µl PicoGreen in 799 µl in 1x TE-Puffer
Bestimmung der LDH-Enzymaktivität	
LDH-Substratlösung	CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay
Stopplösung	CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay
Bestimmung der ALP-Aktivität	
ALP-Stopplösung	+ 1 M NaOH in deionisiertem H ₂ O
ALP-Substratlösung	+ 1 mg/ml p-Nitrophenylphosphat in ALP-Substratpuffer
ALP-Substratpuffer	+ 0,1 M Diethanolamin + 0,1% Triton® X-100 + 1 mM MgCl ₂ in bidest. H ₂ O
Färbung vitaler Zellen mittels MTT	
MTT-Lösung	5 mg 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid in 1 ml in PBS (ohne Ca/Mg)

Zellyse

Die Zellyse erfolgte zuerst durch das Einfrieren der Zell-besiedelten Scaffolds oder der Zellen in den Zellkulturplatten bei -80°C an den verschiedenen Versuchszeitpunkten. Zur weiteren Analyse wurden die Proben aufgetaut, mit Lysepuffer versehen, für 40 min auf Eis inkubiert und für 10 min im gekühlten Ultraschallbad behandelt. Das so erhaltene Zelllysate diente anschließend zur Bestimmung der Enzym-Aktivität bzw. des DNA-Gehaltes.

3.9.1 Bestimmung des DNA-Gehaltes

Die Quantifizierung der DNA-Menge wurde mit Hilfe einer PicoGreen-Färbelösung durchgeführt. 10 μl des Zelllysates wurden mit 190 μl der Arbeitslösung vermischt und in einer schwarzen 96 Well-Platte (Nunc) für 5 min im Dunkeln schüttelnd inkubiert. Die Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 535 nm (Anregung mit einer Wellenlänge von 485 nm) detektiert (Mikroplatten-Reader infinite M200 PRO, Tecan). Für den jeweiligen Versuch wurde eine Kalibrierungsreihe (0,5; 1; 2; 4; 8; 16×10^3 HDMEC) mitgeführt; dadurch konnte anhand des DNA-Gehaltes die Zellzahl der Proben bestimmt werden.

3.9.2 Bestimmung der LDH-Aktivität

Die Laktatdehydrogenase ist ein Enzym, welches im Zytoplasma lebender Zellen vorkommt. Nach der Zellyse wird dieses Enzym durch die Zerstörung der Zellmembran in den Überstand freigesetzt, wo es detektiert werden kann. Hierbei wird die Enzymaktivität quantitativ mit einem CytoTox 96® Non-Radioactive Assay bestimmt (PROMEGA, 2012), wobei das Lactat zu Pyruvat umgesetzt und zugleich NAD^+ zu NADH reduziert wird, was wiederum die Umsetzung von Iodonitrotetrazoliumchlorid in ein rotes Formazan-Derivat durch das Enzym Diaphorase ermöglicht. Die Intensität der entstehenden Rotfärbung ist proportional zur LDH-Aktivität und kann photospektrometrisch bei einer Wellenlänge von 492 nm detektiert werden (Mikroplatten-Reader).

Zur Durchführung des Assays wurden 50 μl des Zelllysates mit 50 μl der LDH-Substratlösung in einer 96 Well-Platte gemischt, für 30 min auf dem Schüttler im Dunkeln inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 50 μl einer Stopp-Lösung beendet. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 492 nm mit einem Mikroplatten-Reader gemessen. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde für den jeweiligen Versuch eine Kalibrierungsreihe (0,5; 1; 2; 4; 8; 16 und 32×10^4 hMSC) mitgeführt und die LDH-Aktivität mit der Zellzahl korreliert.

3.9.3 Bestimmung der spezifischen ALP-Aktivität

Die alkalische Phosphatase ist ein Membranprotein, welches in Osteoblasten vorkommt und die Hydrolyse von Phosphorsäureestern katalysiert. Es wird als ein früher Marker für die Knochenmineralisierung und zur Analyse der osteogenen Differenzierung verwendet.

Die spezifische ALP-Aktivität von osteoblastären Zellen wurde kolorimetrisch nachgewiesen. Zur Bestimmung wurden 20 µl des Zelllysates mit 100 µl der ALP-Substratlösung in einer 96 Well-Platte vermischt, anschließend kurz geschüttelt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Während der Inkubation wird das farblose p-Nitrophenylphosphat (pNpp) durch die ALP zu gelbem Paranitrophenol (pNp) dephosphoryliert. Die Reaktion wurde nach 30 min durch die Zugabe von 80 µl einer ALP-Stopp-Lösung beendet. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm mittels Mikroplatten-Reader gemessen.

3.9.4 MTT-Färbung vitaler Zellen

Um die Verteilung der Zellen im Scaffold und deren Vitalität zu untersuchen, wurde eine MTT-Färbung durchgeführt. Hierbei wurde die MTT-Lösung 1:10 mit dem Proliferationsmedium für die hMSC verdünnt und die Scaffolds für weitere 4 h kultiviert. Das gelbe Tetrazoliumsalz wird von vitalen Zellen aufgenommen und zu einem wasserunlöslichen, blauen Formazan-Derivat reduziert (Berridge und Tan, 1993), so dass eine hohe Dichte an vitalen Zellen durch eine intensive Blaufärbung der jeweiligen Scaffold-Region sichtbar wurde. Die Dokumentation der angefärbten Scaffolds erfolgte mit Hilfe einer Digitalkamera (Canon Powershot G11).

3.9.5 Rasterelektronenmikroskopie zur Bestimmung der Zellverteilung im Scaffold

Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie konnten Rückschlüsse auf die Zellverteilung im Scaffold, die Zelldichte sowie die Vitalität anhand der Zellmorphologie auf der Scaffoldoberfläche bzw. im Scaffoldinneren gezogen werden.

Für die Probenpräparation wurden die Scaffolds zunächst mit PBS gewaschen, dann in einer Fixierlösung (4% Formaldehyd) für ca. 1 h fixiert und im Kühlschrank über Nacht gelagert. Danach wurden die Proben mit deionisiertem Wasser gewaschen und das Wasser in den Proben wurde schrittweise durch Ethanol in einer aufsteigenden Alkoholreihe (10, 30, 50, 70, 80, 96 und 99,6%) ersetzt. Die Kritisch-Punkt-Trocknung der Proben erfolgte durch Austausch des Ethanols mit CO₂ (CPD 030 (BAL-TEC)). Anschließend wurden die Proben auf Aluminiumpins fixiert, mit Leitsilber abgeleitet und mit Gold beschichtet (Sputter Coater SCD 050 (Balzers)). Die Proben wurden mit einem XL 30 ESEM-FEG (Phillips) bei einer Beschleunigungsspannung von 1 kV analysiert.

3.10 Statistische Methoden

Für alle biochemischen Analysen wurden mindestens 3 Proben des gleichen Materials miteinander verglichen. Die Mittelwerte ($n=3$) wurden in den Diagrammen dargestellt und die Standardabweichung (\pm) wurde aus dem arithmetischen Mittel berechnet und als Fehlerbalken illustriert. Für die statistische Auswertung der Daten wurde eine Ein- bzw. Zwei-Wege ANOVA (Analysis of Variance) durchgeführt und die Unterschiede mittels Tukey-Tests mit einer Signifikanzebene von $p=0,05$ untersucht (OriginPro9.1.0G, b215, Origin Lab. Corp.).

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden zwei grundlegende Strategien zur Funktionalisierung von Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen mit dem Ziel verfolgt, die Freisetzung eines Modellwachstumsfaktors (VEGF) aus dem Material langanhaltend zu verzögern, gleichzeitig die biologische Aktivität des Faktors durch das Drug Delivery-System zu erhalten und Zellen in das funktionalisierte Scaffold durch Chemoattraktion anzulocken.

Dabei wurden die Scaffolds zum einen mit Heparin modifiziert und zum anderen wurde ein VEGF-haltiges Depot aus verschiedenen Komponenten in das Scaffold injiziert.

4.1 Heparin-Modifizierung von Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen

Die Modifizierung von Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen mit Heparin wurde in zwei verschiedenen Ansätzen durchgeführt. Bei den „insitu“-modifizierten Varianten wurde Heparin vor der Kollagenfibrillierung und Mineralisierung zugegeben, so dass der Prozess zur Herstellung eines Nanokompositmaterials in Gegenwart von Heparin („in situ“) ablief. Eine nachträgliche Modifizierung der hergestellten Scaffolds mit Heparin wurde bei den „post“-modifizierten Scaffolds angewendet.

Im Rahmen der Materialcharakterisierung wurden Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen (Heparin-frei) und modifiziert mit Heparin untersucht. Das gebundene Heparin wurde in den Scaffolds qualitativ und anschließend quantitativ mit Hilfe einer Färbelösung nachgewiesen. Hierbei wurde untersucht, ob die Art der Modifizierung („insitu“ und „post“) einen Einfluss auf die gebundene Menge und Stabilität der Bindung des Heparins am Scaffold hatte. Zudem wurden die Morphologie der Scaffolds und die mechanischen Eigenschaften bestimmt. Des Weiteren wurden zellbiologische Untersuchungen zur Klärung der Frage durchgeführt, ob gebundenes Heparin bzw. die Art der Heparin-Modifizierung die Proliferation und osteogene Differenzierung von hMSC beeinflusst. Ein weiterer wichtiger Punkt war die Funktionalisierung mit dem Wachstumsfaktor VEGF und die Bestimmung der Freisetzung aus Heparin-modifizierten und Heparin-freien Scaffolds, sowie die Testung der biologischen Aktivität des freigesetzten Faktors.

4.1.1 Heparinbindung

Vorversuche zur Heparinbindung am Scaffold

In Anlehnung an Erfahrungen aus Vorarbeiten mit Heparin-modifizierten Calciumphosphatzementen (Lode et al., 2008) in der Gruppe von Prof. Gelinsky, bei denen Konzentrationen von 5, 20, 50 und 100 mg Heparin/g Zementpulver eingesetzt wurden, wurden die Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen mit bestimmten Mengen an Heparin (30, 75 und 150 mg Heparin/

g min. Koll.) modifiziert. Die Bindung von Heparin an den Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen wurde zunächst mit großen Mengen an Heparin getestet. Es wurden Heparinkonzentrationen im Bereich von 150 bis 800 mg Heparin/g min. Koll. eingesetzt, wobei die Scaffolds nach der Herstellung modifiziert wurden („post“-Modifizierung). Anhand dieser Ergebnisse wurden dann, geringere Heparinmengen für weitere Experimente definiert.

In Abbildung 14 A) ist die Menge an Heparin, die an den Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen gebunden wurde, dargestellt. Hierbei zeigte sich, dass bei einer Konzentration von über 150 mg Heparin/g min. Koll. eine schnelle Sättigung in einem Bereich von 200 bis 220 mg Heparin/g min. Koll. eintrat. Bei einer Einsatzmenge von über 200 mg Heparin konnte das restliche Heparin in der Lösung somit nicht mehr am Scaffold binden. Abbildung 14 B) verdeutlicht dies, indem das Verhältnis der eingesetzten zur gebundenen Heparinmenge in Prozent dargestellt ist. Die Differenz zum detektierten Heparin in den Scaffolds (sprich: ungebundenes Heparin) wurde in der Inkubationslösung der Scaffolds nahezu vollständig wiedergefunden (Abbildung 15).

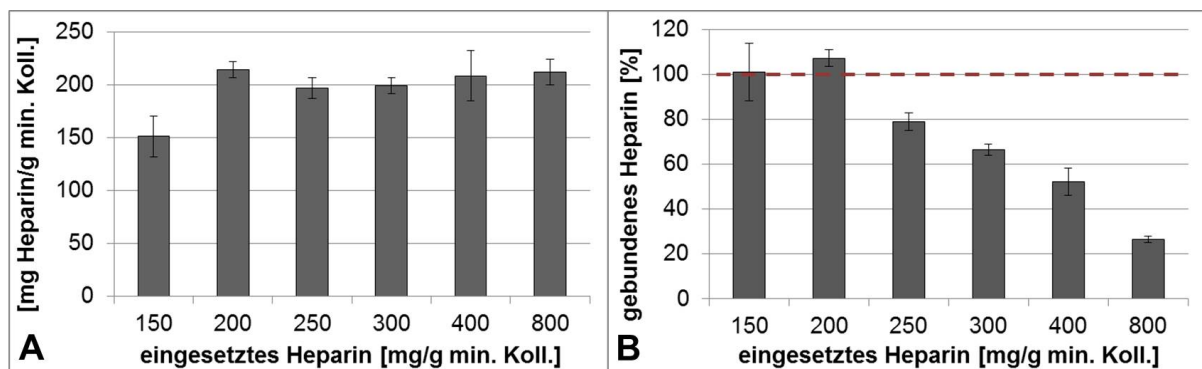


Abbildung 14: Menge an gebundenem Heparin an „post“-modifizierten Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen. Der Nachweis erfolgte mittels DMMB-Methode (n=3, Mittelwert \pm Stabw). A) Menge an gebundenem Heparin. B) Effizienz der Heparinmodifizierung, dargestellt in Prozent des gebundenen Heparins im Verhältnis zur eingesetzten Heparinmenge.

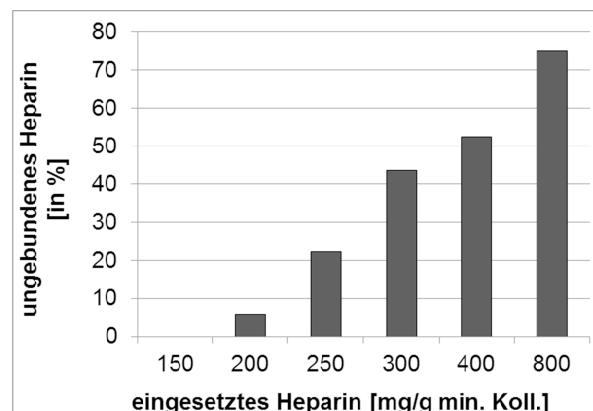


Abbildung 15: Menge an ungebundenem Heparin in der Inkubationslösung von „post“-modifizierten Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen. Der Nachweis erfolgte mittels DMMB-Methode. Die Lösung wurde nach einer Inkubation der Scaffolds von 12 h entnommen.

Quantifizierung des Heparingehaltes

Die Bindungseffizienz und Bindungsstabilität des Heparins an den Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen mit den ausgewählten Heparinkonzentration (30, 75 und 150 mg Heparin/g min. Koll.) wurde bestimmt, um den Einfluss der Modifizierung und der eingesetzten Heparinmenge zu untersuchen.

Die an Scaffolds (der Charge I-55, interne Bez.) gebundene Heparinmenge wird in Abbildung 16 dargestellt. Hierbei wird ersichtlich, dass sich die Heparin-Modifizierungen „insitu“ und „post“ in ihrer Bindungseffizienz voneinander unterscheiden. Die Heparin-freie Variante wurde bei den Messungen als Negativkontrolle mitgeführt. Da erwartungsgemäß kein Signal detektiert werden konnte, wurde die Variante nicht mit in die Abbildungen aufgenommen.

Bei allen „post“-modifizierten Varianten konnte die eingesetzte Heparinmenge (markiert mit einer roten, gestrichelten Linie) für den verwendeten Kollagenansatz komplett detektiert werden (Abbildung 16 A). Bei der „insitu“-Modifizierung war die Bindungseffizienz geringer. Hierbei wurde die eingesetzte Heparinmenge nicht vollständig an das Scaffoldmaterial gebunden. In Abbildung 16 B) wird das Verhältnis der eingesetzten Heparinmenge des jeweiligen Kollagenansatzes zum gebundenem Heparin dargestellt. Während bei den Varianten I-75 und I-150 noch 70% des eingesetzten Heparins in den Scaffolds detektiert wurde, waren es bei der Variante I-30 nur ca. 50%. Die „post“-modifizierten Varianten schwankten im Bereich von 95-105%. Zusätzlich wurden die Inkubationslösungen bzw. der Überstand untersucht. Es konnte hierbei kein Heparin detektiert werden, da im Falle der „post“-modifizierten Scaffolds nahezu das gesamte Heparin gebunden wurde und bei den „insitu“-modifizierten Scaffolds vermutlich die Nachweisgrenze des DMMB-Assays zu gering war.

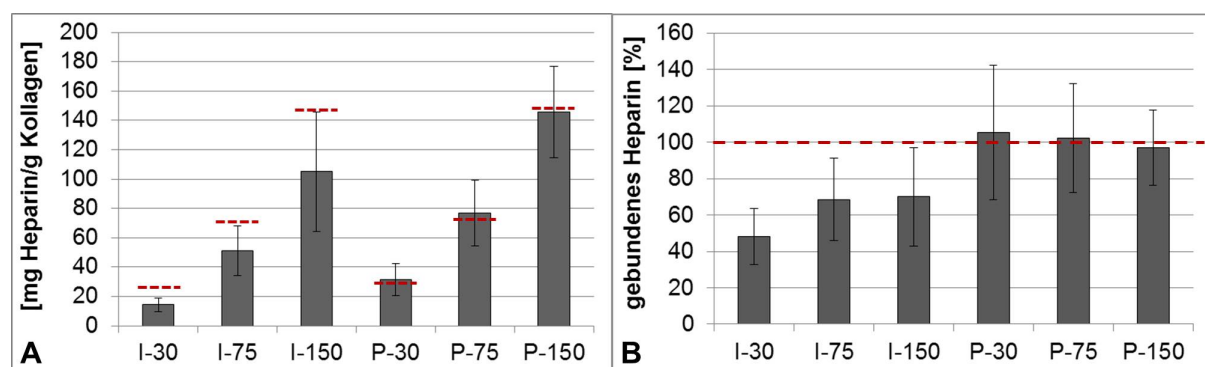


Abbildung 16: Heparingehalt der „insitu“- und „post“-modifizierten Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen. Die Bestimmung erfolgte mittels DMMB-Methode. Es wurden 3 verschiedene Heparinkonzentrationen (30, 75 und 150 mg Heparin/g min. Koll.) eingesetzt (n=5, Mittelwert \pm Stabw). A) Menge an gebundenem Heparin. B) Effizienz der Heparinbindung, dargestellt in Prozent des gebundenen Heparins im Verhältnis zur eingesetzten Heparinmenge.

Für die Versuche zur Stabilität der Bindung von Heparin an den Scaffolds wurde Kollagen einer anderen Charge (interne Bez. I-79) eingesetzt. Hierbei wurden „insitu“- und „post“-modifizierte Scaffolds über 28 Tage unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Die gebundene Heparinmenge wurde anschließend ermittelt und mit modifizierten Scaffolds, welche nicht inkubiert wurden, verglichen und daraus die Bindungsstabilität abgeleitet. Bei allen getesteten Varianten („insitu“- und „post“-modifiziert) kam es während der Inkubation über 28 Tage zu einer Reduktion der gebundenen Heparinmenge.

Abbildung 17 zeigt die Stabilität der Heparinbindung (dargestellt in Prozent des gebundenen Heparins im Verhältnis zur eingesetzten Heparinmenge) ohne Inkubation (A) und nach einer 28-tägigen Inkubation unter Zellkulturbedingungen (B). Es wurde nachgewiesen, dass die Abnahme des Heparingehaltes während der Inkubation bei den „insitu“-modifizierten Varianten tendenziell größer war als bei den „post“-modifizierten Varianten.

Während die gebundene Heparinmenge ohne Inkubation (A) bei den „insitu“-modifizierten Varianten bei 60% lag (eine Ausnahme bildet die Variante I-75), schien die Bindungsstabilität der „post“-modifizierten Varianten mit 80% stärker zu sein. Nach einer 28-tägigen Inkubation (B) wurde noch 45% des eingesetzten Heparingehaltes bei den „insitu“-modifizierten Varianten detektiert; somit lösten sich 15% des Heparins aus den Scaffolds. Im Vergleich dazu nahm die Stabilität der Bindung bei den „post“-Varianten mit zunehmender Heparinkonzentration ab, wobei die Variante P-30 den geringsten Verlust an gebundenem Heparin (weniger als 10%) aufwies.

Allerdings wiesen die Ergebnisse mit der Charge I-55 (Abbildung 16 B) im Vergleich mit den Scaffolds der Charge I-79 (Abbildung 17 A) gewisse Chargenunterschiede auf, welche sich in der Menge an gebundenem Heparin an den Scaffolds („insitu“- und „post“-modifiziert) widerspiegelte.

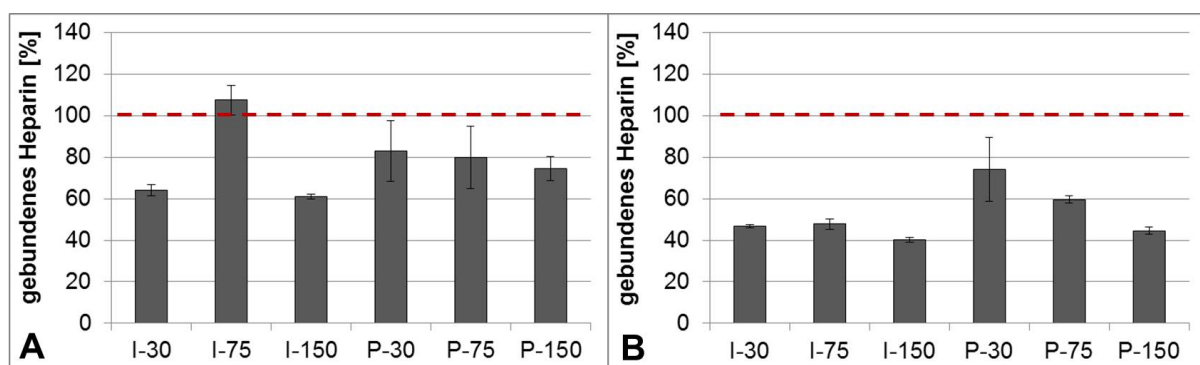


Abbildung 17: Heparingehalt der „insitu“- und „post“-modifizierten Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen nach der Herstellung (A) und nach 28 Tagen Inkubation unter Zellkulturbedingungen (B) (n=5, Mittelwert \pm Stabw). Die Bestimmung erfolgte mittels DMMB-Methode.

Um die gebundene bzw. den Verlust der gebundenen Heparinmenge an den jeweiligen Scaffoldvarianten besser zu veranschaulichen, wurden die ermittelten Werte der gebundenen Heparinmenge ohne Inkubation der Scaffolds auf 100% gesetzt und die Differenz zur gemessenen Heparinmenge der jeweiligen Scaffoldvarianten nach einer Inkubation von 28 Tagen gebildet (siehe Abbildung 18). Hierbei zeigte sich eine teilweise signifikante Abnahme der gebundenen Heparinmenge an den Scaffolds. Die Differenz zum gebundenen Heparin Gehalt nach 28-tägiger Inkubation zur gebundenen Heparinmenge ohne Inkubation war bei den „insitu“- im Gegensatz zu den „post“-modifizierten Varianten etwas kleiner. Eine Ausnahme bildete hierbei die Variante I-75, welche mit einer signifikant kleineren Differenz von 45% aus dem Rahmen fiel. Des Weiteren schien mit zunehmender Heparinkonzentration auch die Differenz der gebundenen Heparinmenge abzunehmen. Im Falle der „insitu“-Varianten war dies nur leicht zwischen den Varianten I-30 und I-150 ersichtlich, wobei der Unterschied bei den „post“-Varianten signifikant (zwischen P-30 und P-150) war.

Der Versuch zeigte, dass ein Teil des am Scaffold gebundenen Heparins während der Inkubationszeit aus den Scaffolds freigesetzt wurde. Die Höhe der Differenz war dabei eher abhängig von der eingesetzten Heparinkonzentration als von der Modifizierungsart.

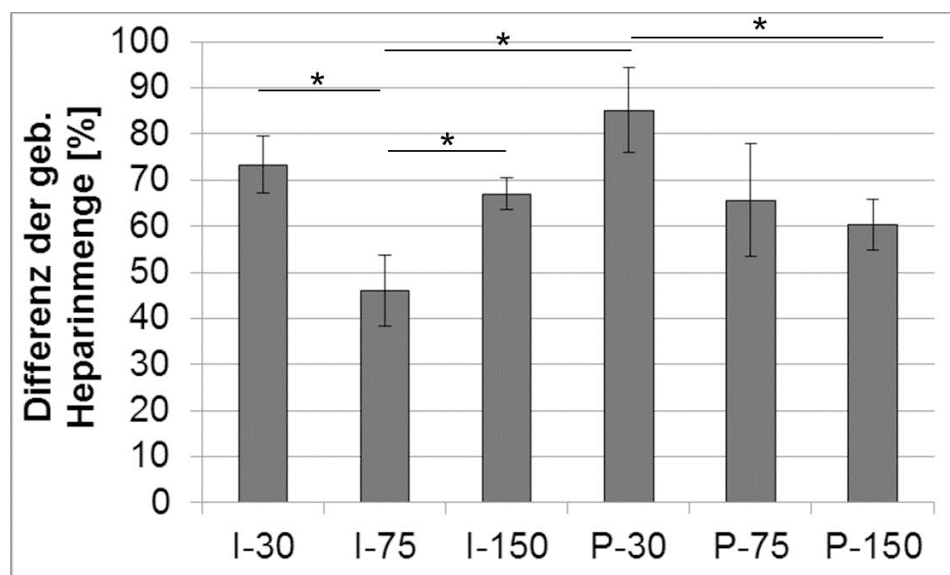


Abbildung 18: Differenz der gebundenen Heparinmenge von Heparin-modifizierten Scaffolds nach 28-tägiger Inkubation zur gebundenen Heparinmenge an frisch hergestellten Scaffolds. Die ermittelte Heparinmenge, gebunden an der jeweiligen Scaffoldvariante nach der Herstellung der Scaffolds wurde auf 100% gesetzt und mit der gemessenen Heparinmenge der Scaffolds nach 28-tägiger Inkubation (unter Zellkulturbedingungen mit Mediumswechsel) verglichen und die Differenz gebildet. Darstellung der „insitu“-modifizierten und „post“-modifizierten Scaffolds (n=5, Mittelwert \pm Stabw).

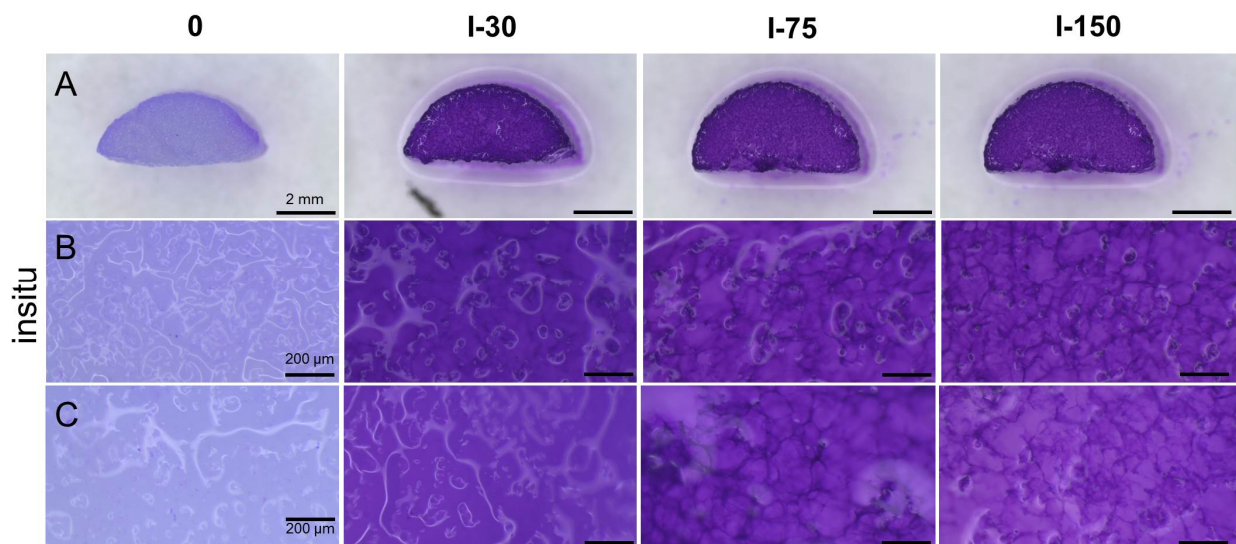
Optischer Nachweis des gebundenen Heparins

Um das gebundene Heparin und die Verteilung in den Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen sichtbar zu machen, wurden diese in einer DMMB-Lösung inkubiert und anschließend mit Hilfe eines Stereomikroskops analysiert. Die Reaktion des kationischen Farbstoffes DMMB mit Heparin ließ sich durch eine violette Färbung nachweisen.

Es konnte durch die intensive Färbung der Scaffoldoberfläche und des –querschnittes mit dem DMMB-Farbstoff bestätigt werden, dass das Heparin an der Struktur der „insitu“- und „post“-modifizierten Scaffolds gebunden hatte. Die Stärke der Färbung war abhängig von der eingesetzten Menge an Heparin.

In Abbildung 19 sind die mit DMMB gefärbten Heparin-modifizierten Scaffolds dargestellt. Der optische Nachweis bei den „insitu“- und „post“-modifizierten Scaffolds konnte die Bindung von Heparin an den Scaffolds und eine gleichmäßige Verteilung des gebundenen Heparins, abhängig von der eingesetzten Heparinkonzentration, an der Oberfläche als auch im Scaffoldinneren belegen. Wird die Intensität der Färbung, hervorgerufen durch die Reaktion mit den unterschiedlich gebundenen Heparinmengen der modifizierten „insitu“-Scaffoldoberflächen (in Bildreihe A) miteinander verglichen, sind keine Unterschiede sichtbar. Ein Unterschied ist erst bei der höheren Vergrößerung in der zweiten Bildreihe (B) zu erkennen. Hier nehmen mit zunehmender Heparinkonzentration (von I-30 zu I-150) dunkelviolette Strukturen, welche die Porenstruktur der Scaffolds abbilden, zu. Bei den Querschnitten der Scaffolds (C) sind die gleichen Strukturen und Intensitäten zu sehen.

Im Falle der „post“-modifizierten Varianten scheint im Vergleich zu den „insitu“-modifizierten die Färbung der Oberfläche (A) etwas schwächer zu sein. Auch bei höherer Vergrößerung (B) sind die gefärbten Porenstrukturen der „post“-modifizierten Scaffolds in Form und Ausprägung denen der „insitu“-modifizierten Scaffolds ähnlich, aber erscheinen weniger intensiv angefärbt zu sein.



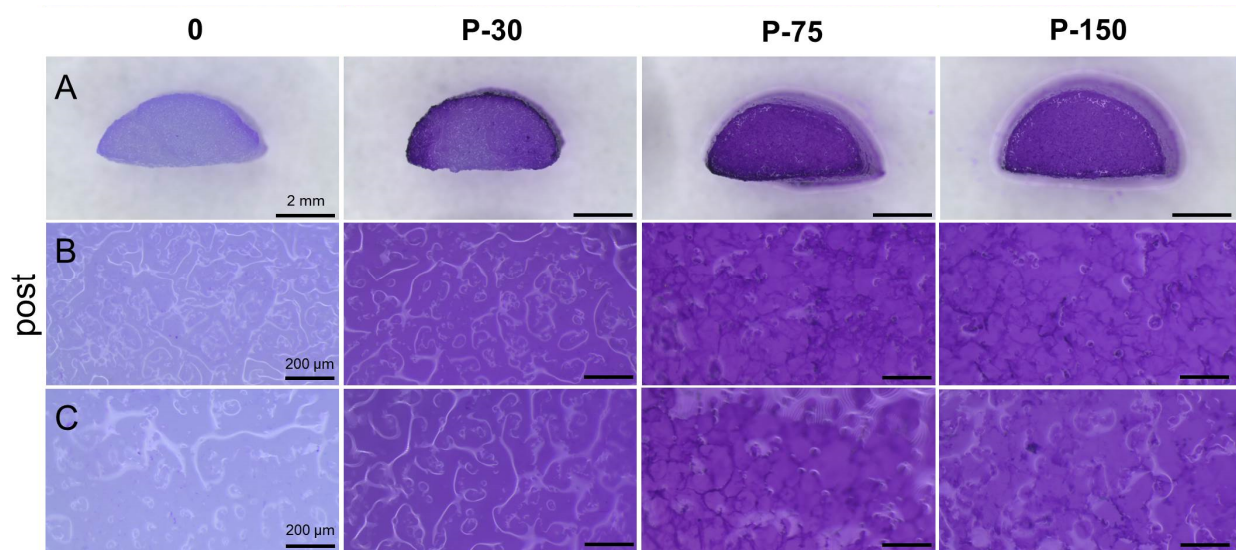


Abbildung 19: Nachweis des an Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen gebundenen Heparins mittels DMMB-Färbung. Abbildungen der „insitu“-modifizierten Varianten im oberen Bereich, im unteren Bereich sind die „post“-modifizierten Varianten dargestellt. Die Bildreihen A und B zeigen die Oberfläche der Scaffolds in verschiedenen Vergrößerungen, Reihe C stellt einen Ausschnitt des Querschnittes dar.

Obwohl der optische Nachweis keine quantitative Aussage über die Menge an gebundenem Heparin erlaubt, scheinen die Färbungen im Widerspruch zu den ermittelten Werten (Abbildung 16) zu stehen. Hierbei wurde mehr gebundenes Heparin bei den „post“-modifizierten als bei den „insitu“-modifizierten Varianten detektiert. Bei Überprüfung der DMMB-Lösung nach der Inkubation fiel auf, dass sich im Überstand der „post“-modifizierten Variante mit der höchsten Heparinkonzentration (P-150) violette Präzipitate befanden (siehe Abbildung 20), die bei den „insitu“-modifizierten Varianten nicht vorhanden waren. Aufgrund des niedrigen pH-Wertes von 3,2 der DMMB-Lösung scheint bei den „post“-modifizierten Varianten ein Teil des Minerals an der Scaffoldoberfläche abgelöst worden zu sein und damit auch das nachträglich am Scaffold gebundene Heparin. Dagegen wird bei den „insitu“-Varianten Heparin in die Kollagenfibrillen integriert und nach der Gefriertrocknung mit vernetzt.

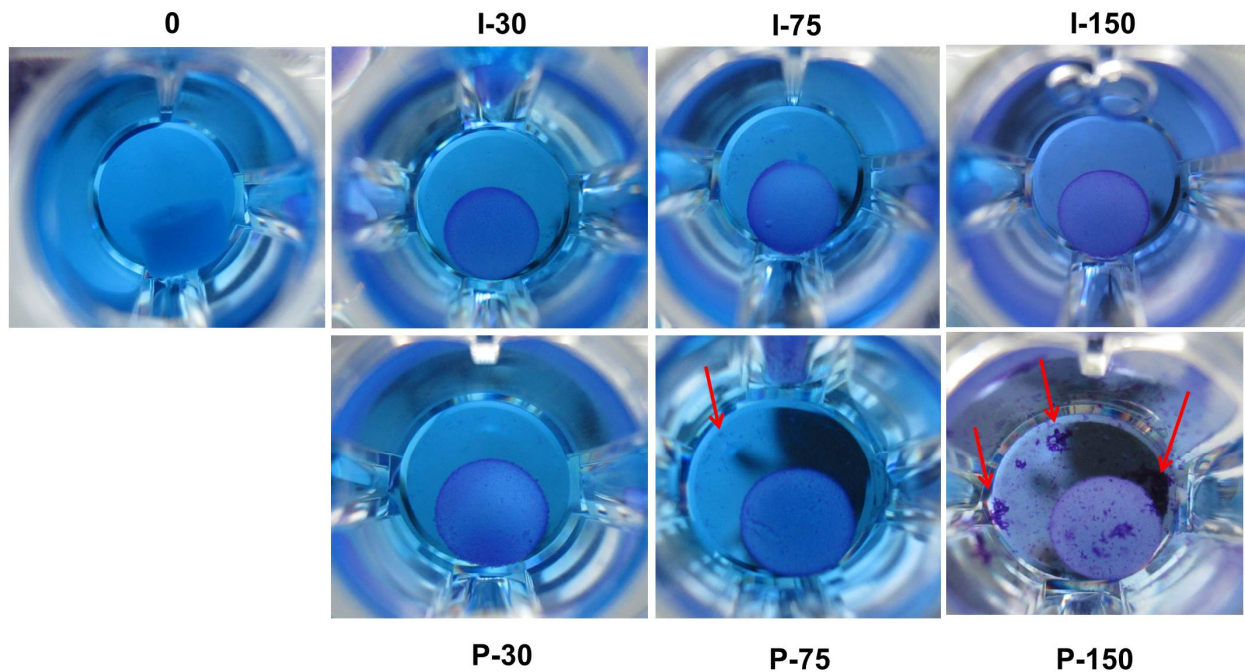


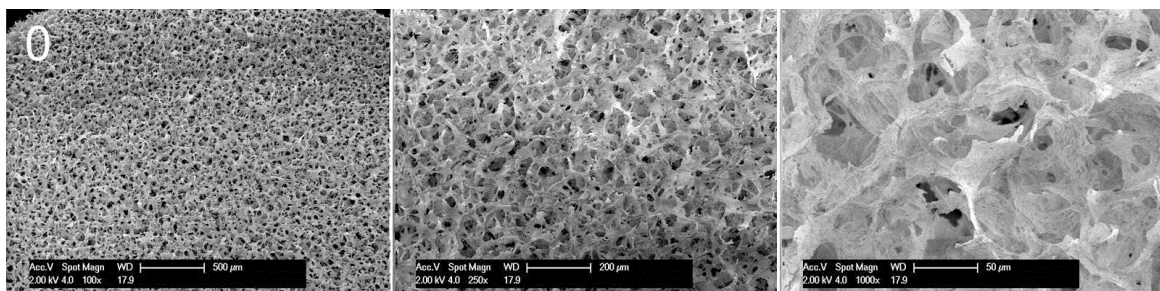
Abbildung 20: Heparin-freie und Heparin-modifizierte Scaffolds nach 10 min Inkubation in einer DMMB-Lösung. Präzipitate wurden mit einem roten Pfeil gekennzeichnet.

4.1.2 Struktur und Zusammensetzung

Porenstruktur der Scaffolds

Morphologische Untersuchungen der mit Heparin modifizierten Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen wurden mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops durchgeführt. Hierbei wurde untersucht, ob die Heparin-Modifizierungen einen Einfluss auf die Bildung der Mikroporenstruktur hatten.

Bei den REM-Aufnahmen (Abbildung 21) wird die interkonnektierende Porenstruktur der Kollagenscaffolds sichtbar. Heparin-freie Scaffolds sowie „insitu“- und „post“-modifizierte Scaffolds wiesen eine ähnliche Struktur auf und der Porendurchmesser lag bei allen Varianten bei ca. 80-150 μm (Software-gestützte Vermessung der Poren innerhalb der Aufnahmen). Heparin schien somit keinen Einfluss auf die Porenstruktur zu haben.



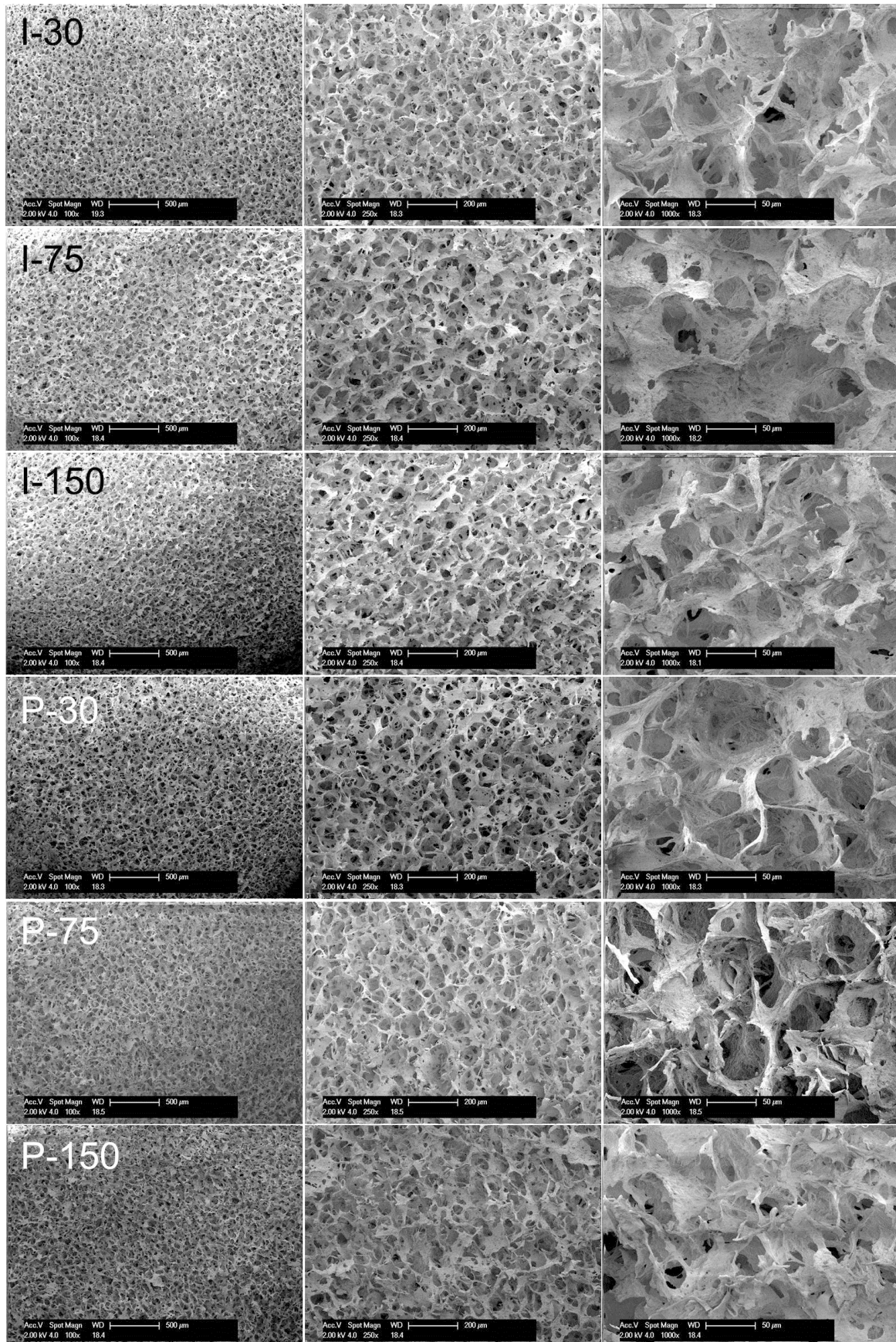


Abbildung 21: REM-Aufnahmen der Oberfläche von mineralisierten Kollagenscaffolds modifiziert mit Heparin. Darstellung der Varianten ohne Heparin (0), „insitu“- (I-30, I-75 und I-150) und „post-modifiziert“ (P-30, P-75 und P-150)

Kristallstruktur der Scaffolds

TEM-Aufnahmen wurden von Heparin-freien Scaffolds und der „insitu“-modifizierten Variante I-150 angefertigt. Dabei wurde untersucht, ob die Gegenwart des Heparins während des Prozesses der synchronen Kollagenfibrillen-Reassemblierung und Mineralisierung die Präzipitation der Calciumphosphat-Phase beeinflusst. „Post“-modifizierte Varianten wurden aufgrund der nachträglichen Bindung des Heparins am Scaffolds nicht untersucht.

In Abbildung 22 ist die Ultrastruktur der Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen ohne Heparin und modifiziert mit Heparin (I-150) dargestellt. Durch die Analyse von nicht-kontrastierten Ultradünnschnitten stellen dunkle Areale und Strukturen die elektronendichten Calciumphosphat-Mineralphasen dar, während helle Stellen indirekt auf Kollagen (+/- Heparin) deuten. Des Weiteren konnte anhand der TEM-Aufnahmen die Orientierung, Morphologie und Form der Calciumphosphat-Kristalle dargestellt werden. Dabei wurde festgestellt, dass die Calciumphosphat-Kristalle in beiden Proben eine Länge von durchschnittlich 50 nm hatten und meist parallel zu den vermuteten, fibrillären Kollagenstrukturen orientiert waren. Zwischen der Kontrollvariante ohne und der „insitu“-modifizierten Variante mit Heparin waren keine Unterschiede in der Morphologie und Form der Kristallplättchen bzw. in ihrer Verteilung zu erkennen. Einzig die Anordnung der Kristallplättchen scheint bei der modifizierten Variante im Gegensatz zur Heparin-freien Variante weniger orientiert zu sein.

Heparin hat somit offenbar keinen Einfluss auf die Morphologie und Form der HAP-Kristallite, eher beeinflusst es die Anordnung der Kristallplättchen im Nanokomposit.

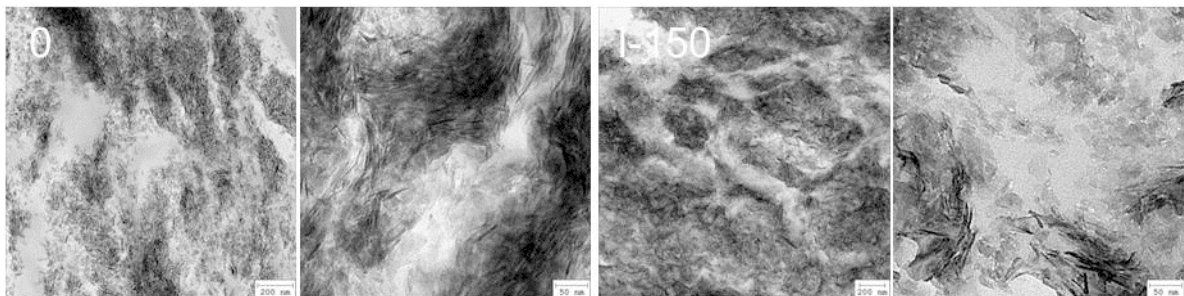


Abbildung 22: TEM-Aufnahmen von nicht kontrastierten Ultradünnschnitten von einem Heparin-freien Scaffold (0) und einer „insitu“-modifizierten Variante (I-150) mit Heparin.

Zusätzlich konnte bei der Röntgenbeugungsanalyse (EDX) der TEM-Schnitte die Mineralphasen der Heparin-freien als auch der „insitu“-modifizierten Variante eindeutig als HAP identifiziert werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Mineralgehalt der Scaffolds

Der Mineralgehalt der Scaffolds wurde bestimmt, um zu untersuchen, ob die Modifizierung mit Heparin einen Einfluss auf die Zusammensetzung (anorganische/organische Phase) der Scaffolds hatte. Tabelle 22 zeigt den Gehalt an anorganischen (Mineral) und organischen Phasen (Kollagen/Heparin) aller Varianten. Im Gegensatz zu der Heparin-freien Variante war die anorganische Phase der „insitu“-modifizierten Varianten um bis zu 3,8% erhöht. Bei den „post“-modifizierten Varianten war der Mineralanteil im Vergleich zur Heparin-freien Variante um bis zu 5,3% reduziert und damit die organische Phase durch die nachträgliche Zugabe von Heparin mengenmäßig leicht erhöht. Mit zunehmender Heparinkonzentration schien tendenziell bei den „insitu“-Varianten der Mineralanteil zuzunehmen, wohingegen die Zunahme der Heparinmenge zu einer Abnahme der Mineralteile bei den „post“-modifizierten Scaffolds führte.

Tabelle 22: Anorganische und organische Phasenanteile von Heparin-freien und modifiz. Scaffolds (n=4)

Variante	Anorganische Phase	Organische Phase
0	64,9 ± 2,9%	37,2 ± 2,9%
I-30	66,8 ± 2,9%	33,2 ± 2,9%
I-75	65,5 ± 2,0%	34,5 ± 2,0%
I-150	67,7 ± 4,9%	32,3 ± 4,9%
P-30	64,2 ± 3,6%	35,8 ± 2,9%
P-75	63,1 ± 4,1%	36,9 ± 2,0%
P-150	59,6 ± 1,9%	40,6 ± 4,9%

4.1.3 Bestimmung der mechanischen Kenngrößen

Die mechanischen Eigenschaften der Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen (Heparin-frei und modifiziert, exemplarisch anhand der Varianten I-150 und P-150) wurden im nassen sowie im trockenen Zustand untersucht. Hierbei wurde die Steifigkeit (E-Modul) sowie die Druckfestigkeit bei 20% Kompression ermittelt. Dabei wurde nachgewiesen, dass die Druckfestigkeit der „insitu“-modifizierten Variante höher war, als die der Heparin-freien und der „post“-modifizierten Variante.

Die Variante I-150 wies im nassen Zustand einen signifikant höheren Elastizitätsmodul von 140 kPa auf, im Vergleich zur Heparin-freie Variante mit 90 kPa und der Variante P-150 mit 80 kPa (Abbildung 23 A). In Abbildung 23 B ist der Elastizitätsmodul der Proben im trockenen Zustand dargestellt. Dabei war die Steifigkeit mit ca. 3,4 MPa (I-150 und 0) signifikant höher als bei der Variante P-150 mit ca. 2,3 MPa.

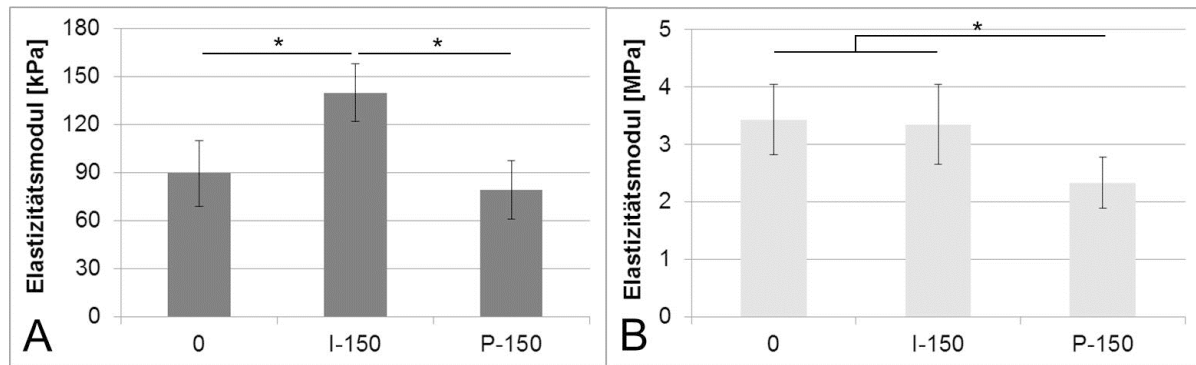


Abbildung 23: Elastizitätsmodul von Heparin-freien und modifizierten Scaffolds (n=10, Mittelwert \pm Stabw, *p<0,05). A) von nassen Scaffolds (für 24 h in SBF gelagert), B) von trockenen Scaffolds.

Des Weiteren wurde die Druckspannung der Scaffolds bei einer Kompression von 20% in Richtung der Zylinderachse bestimmt. Die Druckspannung der Variante I-150 war mit einem Wert von ca. 13 kPa im nassen Zustand (Abbildung 24 A) mit einem Unterschied von ca. 30% signifikant höher als bei den Varianten P-150 und der Heparin-freien Variante. Bei der Messung der Druckspannung von trockenen Scaffolds (B) war der Unterschied zwischen der Variante I-150 und den beiden anderen um ca. 15% geringer, aber immer noch signifikant höher.

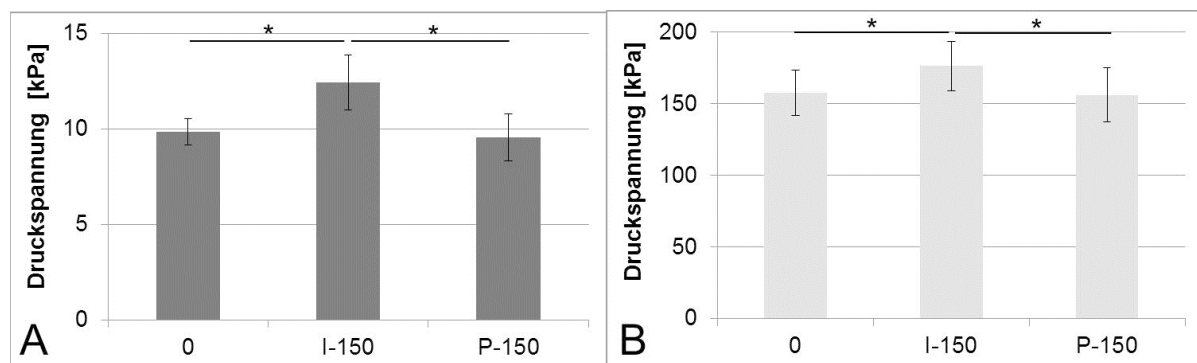


Abbildung 24: Druckspannung von Heparin-freien und modifizierten Scaffolds bei einer Kompression von 20% (n=10, Mittelwert \pm Stabw, *p<0,05). A) von nassen Scaffolds (für 24 h in SBF gelagert), B) von trockenen Scaffolds.

4.1.4 Zellbiologische Charakterisierung der Heparin-modifizierten Scaffolds

Die Biokompatibilität der Heparin-modifizierten Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen im Vergleich zu Heparin-freien Scaffolds wurde anhand von *in vitro* Zellversuchen untersucht. hMSC wurden auf den verschiedenen Scaffoldvarianten z.T. unter Zugabe von osteogenen Supplementen kultiviert. In den Versuchen wurden die Proliferation und die osteogene Differenzierung der Zellen auf den Scaffolds sowie deren Vitalität und Verteilung im Scaffold untersucht.

Vitalität und Verteilung der Zellen in den Scaffolds

An den Zeitpunkten Tag 1, 14 und 28 wurde die Vitalität der Zellen auf den Scaffolds sowie die Zellverteilung im Scaffold mittels MTT und REM untersucht.

In Abbildung 25 ist die MTT-Färbung von ausgewählten Varianten mit und ohne Heparin dargestellt; für die Abbildung wurden nur die Ergebnisse der Modifikationen mit dem höchsten Heparingehalt ausgewählt. Die nicht dargestellten Varianten zeigten ein ähnliches Bild. Es war deutlich zu erkennen, dass die Zellen am Tag 1 metabolisch aktiv sind, sich aber an der Besiedelungsoberfläche befanden. Ein Unterschied zwischen den Varianten war nicht erkennbar. Nach 14 Tagen Kultivierungszeit hatte sich die Zelldichte stark erhöht. Dies war erkennbar durch eine intensivere violette Färbung. Das Einwachsen von Zellen in das Scaffold führte zu einer starken Färbung, mit Ausnahme des unteren Drittels, der Scaffolds. Es schienen sich deutlich mehr Zellen in den beiden Heparin-modifizierten Varianten zu befinden als auf der Heparin-freien Variante. Am Tag 28 waren alle Scaffolds vollständig mit Zellen bewachsen. Ein Unterschied zwischen den Varianten war nicht erkennbar.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Dichte an vitalen Zellen in den untersuchten Scaffolds mit fortschreitender Inkubationszeit kontinuierlich zunahm.

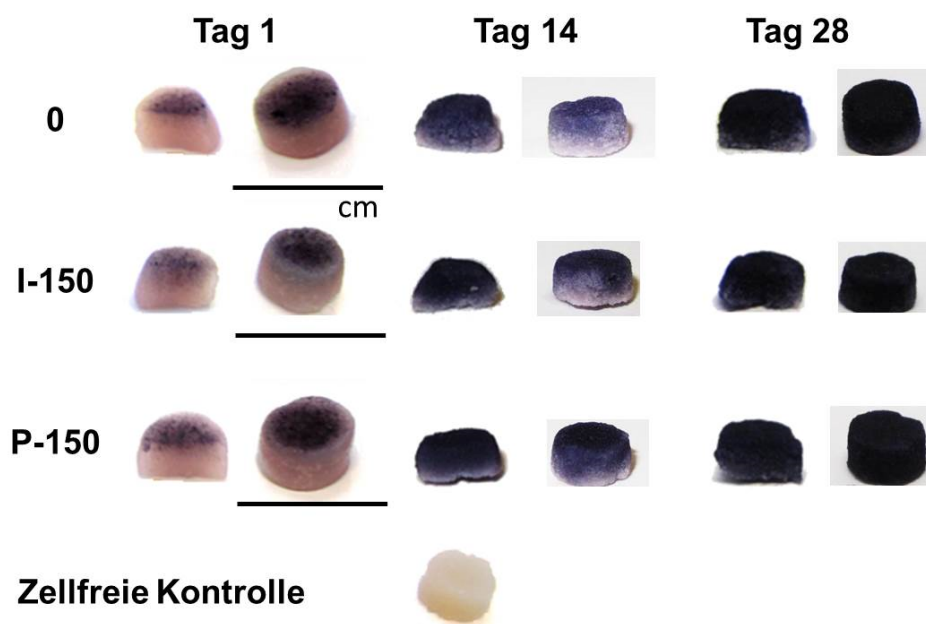


Abbildung 25: MTT-Färbung von zellbesiedelten Scaffolds nach einer Kultivierungsdauer von 1, 14 und 28 Tagen. Intensive Violett-Färbung nach 4 h Inkubationszeit mit einer MTT-Färbelösung visualisiert metabolisch aktive Zellen. Varianten ohne Heparin (0) und mit der höchsten Heparinkonzentration (I-150 und P-150) sind als Querschnitt (linke Bildreihen) und als gesamtes Scaffold (rechte Bilderreihen) dargestellt.

Des Weiteren wurde die Zellverteilung in den Scaffolds anhand von Querschnitten mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Aufgrund der ähnlichen Zellverteilung in den

Varianten werden exemplarisch die Heparin-freie Variante (0) und die Varianten mit dem höchsten Heparin Gehalt (I-150 und P-150) am Tag 1, 14 und 28 dargestellt. Es wurden Scaffoldquerschnitte ausgewählt, um eine bessere Sichtbarkeit der Unterschiede zwischen den Varianten zu ermöglichen. Da sich bereits nach 14-tägiger Inkubation ein Zellrasen auf der Oberfläche der Scaffolds gebildet hatte (Ergebnisse nicht dargestellt).

Am Tag 1 sind bei den Varianten bei 1000-facher Vergrößerung nur sehr wenige Zellen im Querschnitt zu erkennen (siehe Abbildung 26). Nach 14-tägiger Kultivierung konnten mehr Zellen detektiert werden, welche bereits eine extrazelluläre Matrix gebildet hatten. Im Vergleich zur Heparin-freien Variante scheinen die Zellen in den beiden Heparin-modifizierten Scaffolds I-150 und P-150 mehr Matrix gebildet zu haben. Am Tag 28 hatte sich die Zelldichte erhöht und damit auch die von den Zellen gebildete Matrix. Scheinbar gab es keine großen Unterschiede in der Zellverteilung zwischen den Varianten mit Heparin und im Vergleich zur Heparin-freien Variante zu geben. Die Zellen zeigten auf den unterschiedlichen Varianten eine ähnlich typische Morphologie von ausgebreiteten Zellen zwischen den Poren.

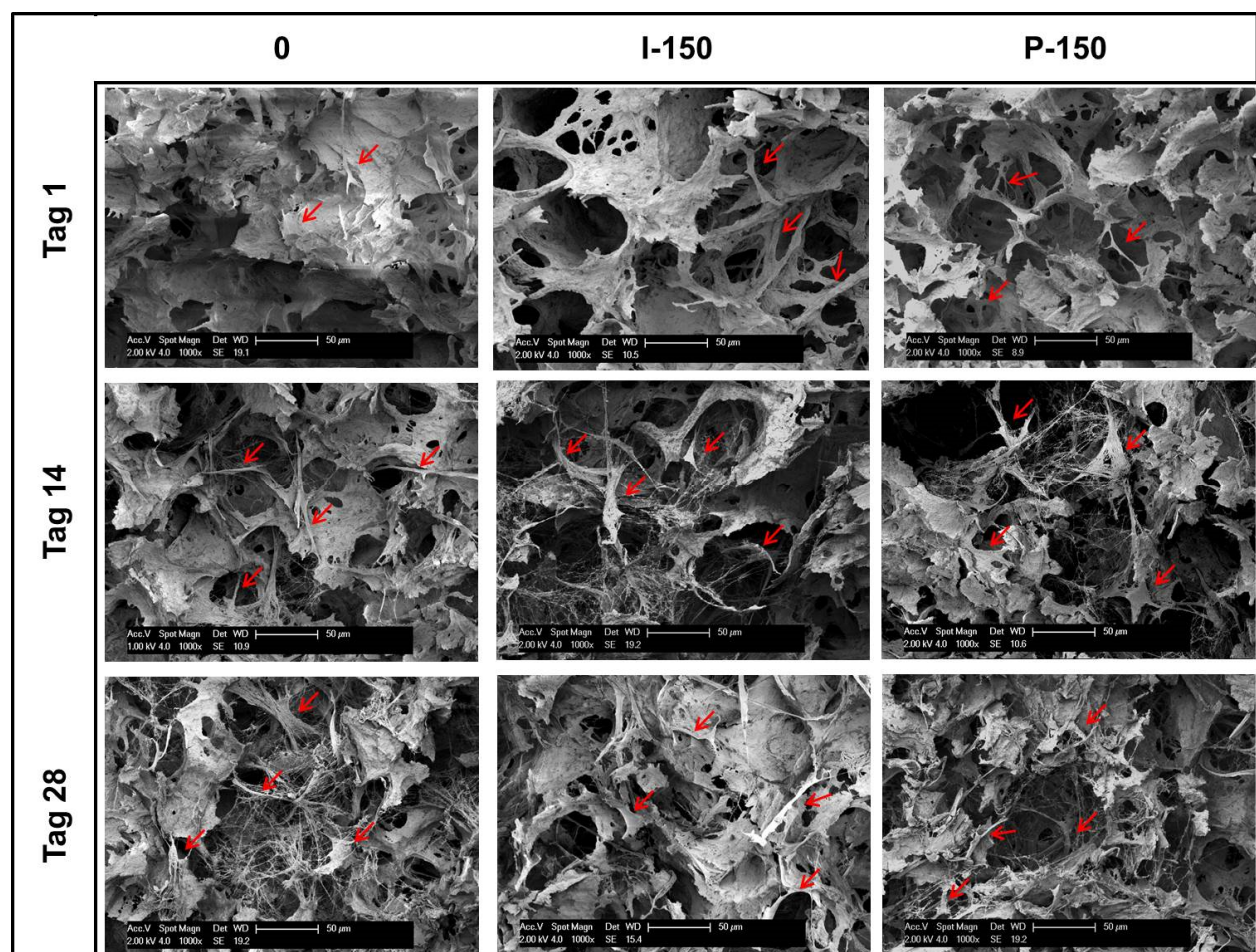


Abbildung 26: Verteilung von hMSC im Querschnitt von Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen am Tag 1, 14 und 28 untersucht mittels REM-Aufnahmen. Dargestellte Varianten „0“, „I-150“ und „P-150“ bei 1000x Vergrößerung.

Proliferation

Die Proliferation der Zellen in den Scaffolds wurde untersucht, indem die Zellzahl zu den Kultivierungszeitpunkten Tag 1, 7, 14, 21 und 28, unter Zugabe von osteogenen Supplementen [+OS] und ohne diese [-OS], bestimmt wurde. In Abbildung 27 ist eine Zunahme der Zellzahl über den Kultivierungszeitraum für alle getesteten Varianten („0“, „insitu“- und „post“-modifizierte Varianten) ersichtlich. Abbildung 27 A und B stellt die Proliferation der Zellen auf „insitu“-modifizierten Varianten dar. Hierbei war die Zellzahl bei den „insitu“-modifizierten Varianten ohne Zugabe (A) und mit Zugabe von osteogenen Supplementen (B) zu jedem gemessenen Zeitpunkt höher (meist signifikant) als bei der Heparin-freien Variante. Eine Tendenz bei den Varianten mit einem unterschiedlichen Heparingehalt war jedoch nicht ersichtlich. In Abbildung 27 C und D ist die Zellproliferation auf „post“-modifizierten Varianten im Vergleich zur Heparin-freien Variante dargestellt. Die Zellzahl auf den „post“-modifizierten Varianten war ohne (C) und mit Zugabe von osteogenen Supplementen (D) zu allen untersuchten Zeitpunkten höher (meist signifikant) als bei der Heparin-freien Variante. Die unterschiedlichen Mengen an eingesetztem Heparin schienen keinen Einfluss zu haben. Es waren keine tendenziellen Unterschiede zwischen den einzelnen „post“-modifizierten Varianten zu erkennen. Wie auch bei den „insitu“-modifizierten Varianten war unter Zugabe von osteogenen Supplementen die Zunahme der Zellzahl höher als ohne Supplemente.

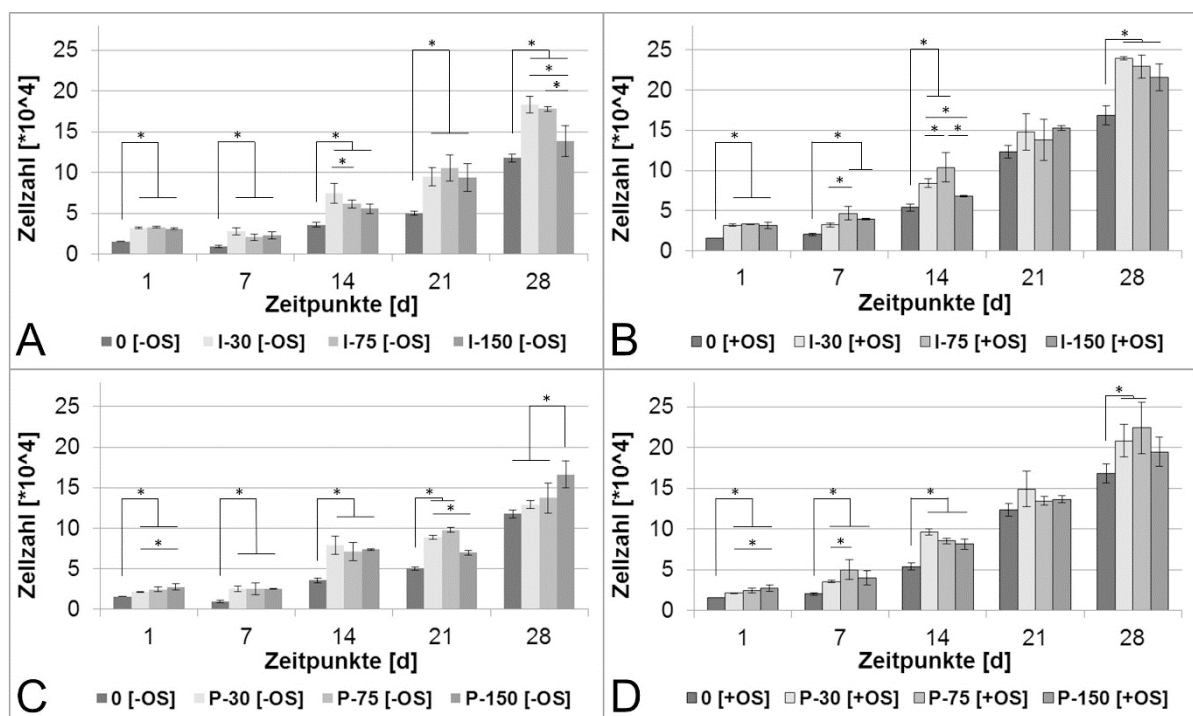


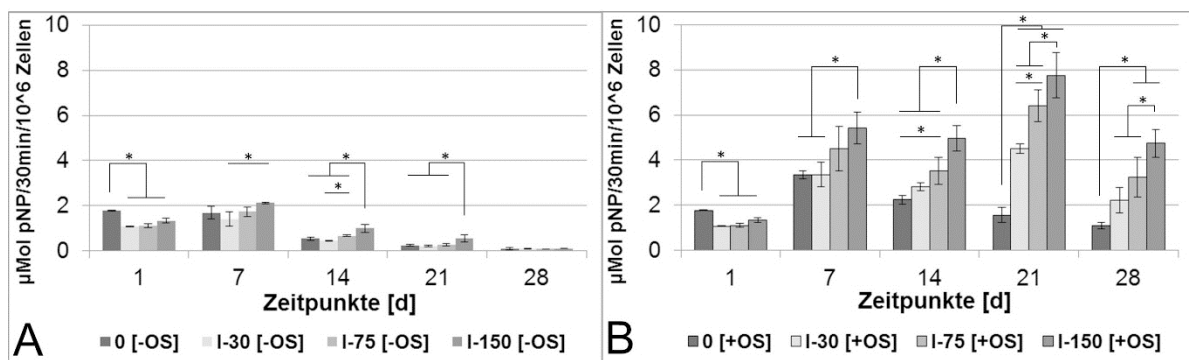
Abbildung 27: Zellproliferation auf Heparin-freien und Heparin-modifizierten Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen über einen Zeitraum von 28 Tagen (n=3, Mittelwert \pm Stabw, *p<0,05). A) „insitu“-modifizierte Varianten ohne Zugabe [-OS], B) „insitu“-modifizierte Varianten mit Zugabe von osteogenen Supplementen im Medium [+OS], C) „post“-modifizierte Varianten [-OS] und D) „post“-modifizierte Varianten [+OS]. Scaffolds wurden mit 5×10^4 Zellen besiedelt.

Osteogene Differenzierung

In Abbildung 28 ist die osteogene Differenzierung anhand der spezifischen ALP-Aktivität von Zellen, gemessen nach einer Kultivierungsdauer von 1, 7, 14, 21 und 28 Tagen, dargestellt. Für alle Varianten war die spezifische ALP-Aktivität der osteogen induzierten Zellen [+OS] deutlich höher als die der nicht induzierten Zellen [-OS]. Es wurden signifikante Unterschiede in der ALP-Aktivität zwischen der Heparin-freien Variante und den modifizierten Scaffolds zu den gemessenen Zeitpunkten gefunden. Hierbei war die ALP-Aktivität der Heparin-modifizierten Varianten im Vergleich zur Heparin-freien Variante deutlich erhöht.

Aufgrund der geringen Zellzahl am Tag 1 schien die spezifische ALP-Aktivität der nicht osteogen-induzierten Zellen etwas erhöht, nahm aber mit Zunahme der Zellzahl an späteren Zeitpunkten ab. Für die Zellen, welche ohne Zugabe von osteogenen Supplementen [-OS] kultiviert wurden (Abbildung 28 A und C), gab es Unterschiede in der ALP-Aktivität zwischen der Heparin-freien Variante und den „insitu“ (A)- bzw. „post“ (C)-modifizierten Varianten. Die ALP-Aktivität nahm während der Kultivierungsdauer von 28 Tagen kontinuierlich ab. Ab Tag 7 (A) zeigte sich, dass Zellen, besiedelt auf der Variante I-150, eine signifikant höhere ALP-Aktivität aufwiesen als Heparin-freie und Heparin-modifizierte (I-30 und I-75) Varianten. Bei Zellen besiedelt auf „post“-modifizierten Varianten war die ALP-Aktivität tendenziell (meist signifikant) höher als bei der Heparin-freien Variante.

Mit Zugabe der osteogenen Supplemente nach 3 Tagen nahm die ALP-Aktivität der Zellen zu und führte zu signifikanten Unterschieden zwischen den „insitu“-modifizierten Varianten (Abbildung 28 B). Am Tag 7 war die ALP-Aktivität der Heparin-freien Variante in einem ähnlichen Bereich wie bei I-30. Allerdings war die ALP-Aktivität bei der Variante mit dem höchsten Heparin Gehalt (I-150), im Vergleich zur Heparin-freien Variante und I-30, signifikant höher. Am Tag 14, 21 und 28 war die ALP-Aktivität der „insitu“-modifizierten Varianten im Vergleich zur Heparin-freien Variante meist signifikant größer. Am deutlichsten wurde dies am Tag 21, bei dem die Heparin-freie Variante einen Wert von $1,5 \mu\text{mol/pNP/30min}/10^6$ Zellen aufwies, im Gegensatz zur Variante I-150 mit einem Wert von $7,8 \mu\text{mol/pNP/30min}/10^6$ Zellen. Innerhalb der Varianten mit unterschiedlichen Heparinkonzentrationen zeigte sich die Tendenz, dass mit steigender Heparinkonzentration auch die ALP-Aktivität zunahm.



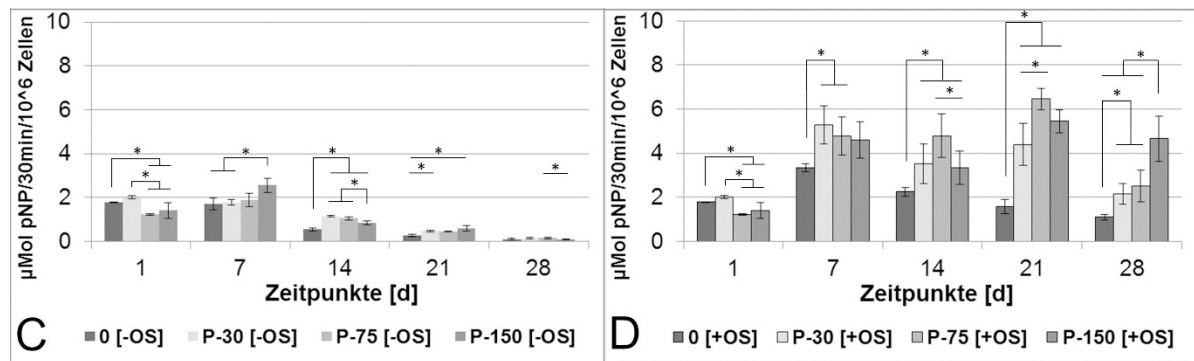


Abbildung 28: Spezifische ALP-Aktivität von hMSC, kultiviert in Heparin-freien und Heparin-modifizierten Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen, zu den Zeitpunkten Tag 1, 7, 14, 21 und 28 (n=3, Mittelwert \pm Stabw, *p<0,05). A) „insitu“-modifizierte Varianten ohne Zugabe [-OS], B) „insitu“-modifizierte Varianten mit Zugabe von osteogenen Supplementen im Medium [+OS], C) „post“-modifizierte [-OS] und D) „post“-modifizierte Varianten [+OS].

Bei den „post“-modifizierten Varianten (Abbildung 28 D) zeigte sich ein ähnliches Ergebnis, bei dem die ALP-Aktivität der modifizierten Varianten ab Tag 7 signifikant höher war als die der Heparin-freien Variante. Der größte Unterschied in der ALP-Aktivität wurde am Tag 21 detektiert, bei dem die Variante P-75 im Vergleich zur Heparin-freien Variante eine 4-mal so hohe ALP-Aktivität aufwies. Allerdings ist die Korrelation zwischen der ALP-Aktivität und dem Heparin Gehalt bei den „post“-modifizierten Varianten nicht so eindeutig wie bei den „insitu“-Modifikationen. Am Tag 7 weist P-30 die höchste ALP-Aktivität der Varianten auf, am Tag 14 und 21 die Variante P-75 und am Tag 28 die Variante P-150.

4.1.5 Funktionalisierung mit VEGF

Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen wurden mit Heparin modifiziert, um einerseits Proteine aus dem Medium zu binden, um die Adhäsion, Proliferation und Differenzierung der Zellen zu fördern (siehe 4.1.4). Es ist bekannt, dass Heparin Wachstumsfaktoren wie VEGF spezifisch bindet, somit diente die Heparin-Modifizierung andererseits zur Bindung und konstanten Freisetzung des in dieser Arbeit verwendeten Wachstumsfaktors VEGF-A₁₆₅. Im Gegensatz zu einer Konzentrierung des Wachstumsfaktors als Depot im Scaffold (siehe 4.2), wurden die Scaffolds in diesem Abschnitt homogen mit VEGF beladen. Das Ziel war es, die Bindungsaffinität des Wachstumsfaktors VEGF mit Hilfe der Heparin-Modifizierung zu erhöhen und damit die Freisetzung zu verzögern, so dass der Faktor langanhaltend und möglichst konstant freigesetzt werden kann.

VEGF-Bindung und -Freisetzung

Es wurde untersucht, inwieweit die Heparin-modifizierten Scaffolds den eingesetzten Wachstumsfaktor VEGF binden und über einen Zeitraum von 28 Tagen wieder freisetzen.

Nach der Beladung der Scaffolds mit 200 ng VEGF wurden sie mehrfach mit Freisetzungsmedium gespült. In dieser Spüllösung wurde das ungebundene VEGF mittels ELISA quantifiziert (siehe Abbildung 29). Im Gegensatz zu der Heparin-freien Variante, bei der 9% (18 ng VEGF) der initial eingesetzten VEGF-Menge nicht gebunden hat, wurde bei den Heparin-modifizierten Varianten „insitu“ und „post“ signifikant mehr VEGF gebunden. Es fand sich in den Überständen nur 0,3 bis 1,5 ng ungebundenes VEGF/ml.

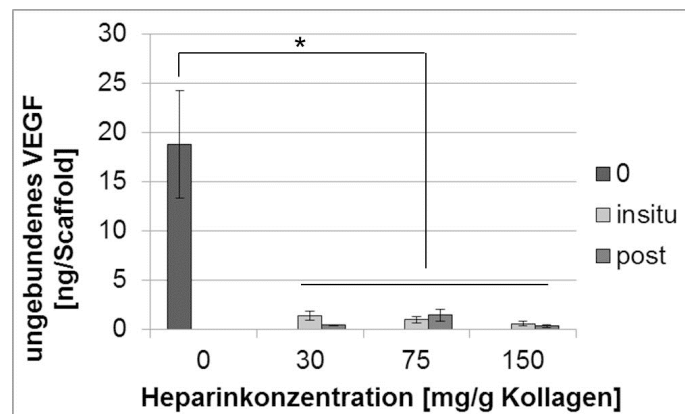


Abbildung 29: Quantifizierung des ungebundenen VEGF mittels ELISA. Scaffolds wurden mit 200 ng VEGF beladen und nach 12 h Inkubation gespült (n=4, Mittelwert \pm Stabw, *p < 0,05).

Um die Freisetzungskinetik des Wachstumsfaktors VEGF zu bestimmen, wurden die Heparin-freie Variante und die mit Heparin-modifizierten Scaffolds für 7 Tage unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Erstmals nach 2 h und anschließend aller 24 h wurde das Freisetzungsmedium (1 ml) ausgetauscht.

In Abbildung 30 ist die tägliche und die kumulative VEGF-Freisetzung aus den Scaffolds dargestellt. Die gemessenen Werte sind im Anhang zusammengefasst.

Abbildung 30 A) zeigt die tägliche Freisetzung von VEGF aus den „insitu“-modifizierten Scaffolds im Vergleich zu Heparin-freien Scaffolds. Hierbei war die VEGF-Freisetzung von der Heparin-freien Variante zu allen gemessenen Zeitpunkten (bis auf Tag 7) signifikant höher als bei Varianten modifiziert mit Heparin. Innerhalb der ersten 3 Tage war ein hoher „initial burst“ mit bis zu 71 ng VEGF/ml am Tag 1 zu erkennen, wohingegen die initiale Freisetzung bei der Variante I-30 mit 12 ng VEGF/ml stark reduziert wurde. Bei den Varianten mit höheren Heparinkonzentrationen war am Tag 1 kein „initial burst“ vorhanden und dementsprechend wurde nur wenig VEGF freigesetzt (I-75 mit 4 ng und I-150 mit 2,5 ng VEGF/ml). Wird der Verlauf der VEGF-Freisetzung bis zum Tag 7 betrachtet, so nahm die Freisetzung bei der Heparin-freien Variante kontinuierlich ab und bei den Heparin-modifizierten Varianten blieb sie annähernd konstant, wobei bei der Variante I-30 tendenziell mehr freigesetzt wurde als bei den beiden anderen Varianten.

In Abbildung 30 B) ist die VEGF-Freisetzung aus „post“-modifizierten Varianten zu erkennen. Es zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei den „insitu“-Varianten. Bis zum Tag 6 setzte die Heparin-freie Variante im Vergleich zu Heparin-modifizierten Varianten („post“) signifikant mehr frei. Auch hier gab es im Gegensatz zur Heparin-freien Variante keinen „initial burst“. Die Freisetzung am Tag 1 unterschied sich bei allen Heparin-Varianten kaum, während sie über den Zeitraum von 7 Tagen bei P-30 (geringste eingesetzte Heparinkonzentration) fast doppelt so hoch war wie bei den Varianten P-75 und P-150.

Die Heparin-Modifizierung („insitu“ und „post“) der Scaffolds bewirkte, durch die erhöhte Bindungsaffinität des beladenen Wachstumsfaktors, eine stark reduzierte initiale und eine anschließend konstante Freisetzung im Gegensatz zur Heparin-freien Variante.

Die kumulative VEGF-Freisetzung in Abbildung 30 C und D ist für die Heparin-modifizierten Varianten ähnlich. Allerdings ist der Unterschied zwischen den verschiedenen Heparinkonzentrationen (30, 75 und 150 mg Heparin/g min. Koll.) der „insitu“-modifizierten Scaffolds im Vergleich zu den „post“-modifizierten Varianten deutlicher. Insbesondere setzte die Variante I-30 mehr VEGF über den Zeitraum frei als die „post“-modifizierte Variante P-30.

Im Vergleich zur Heparin-freien Variante, bei der über den gemessenen Zeitraum von 7 Tagen die initial eingesetzte VEGF-Menge fast vollständig freigesetzt wurde, wurden aus den modifizierten Varianten nur zwischen 12 und 25% VEGF freigesetzt. Auch die Freisetzungskinetik war zwischen der Heparin-freien Variante und den Heparin-modifizierten Varianten sehr unterschiedlich.

Bei den „insitu“-Varianten (C) zeigte sich deutlich eine Abhängigkeit der VEGF-Freisetzung von der eingesetzten Heparinkonzentration. Während bei der Variante I-30, mit der geringsten Heparinkonzentration, nach 7 Tagen 56 ng VEGF freigesetzt wurde, wurde nur 36 ng aus der Variante I-75 und 26 ng VEGF bei der Variante I-150 freigesetzt. Dagegen war das Ergebnis bei der VEGF-Freisetzung von den „post“-modifizierten Varianten (D) etwas unterschiedlich. Während die Menge bei den Varianten P-75 und P-150 mit 30 ng bzw. 27 ng VEGF annähernd gleich und ähnlich zu den entsprechenden „insitu“-modifizierten Varianten war, war die freigesetzte Menge mit insgesamt 40 ng VEGF bei der Variante P-30 deutlich niedriger als bei der Variante I-30.

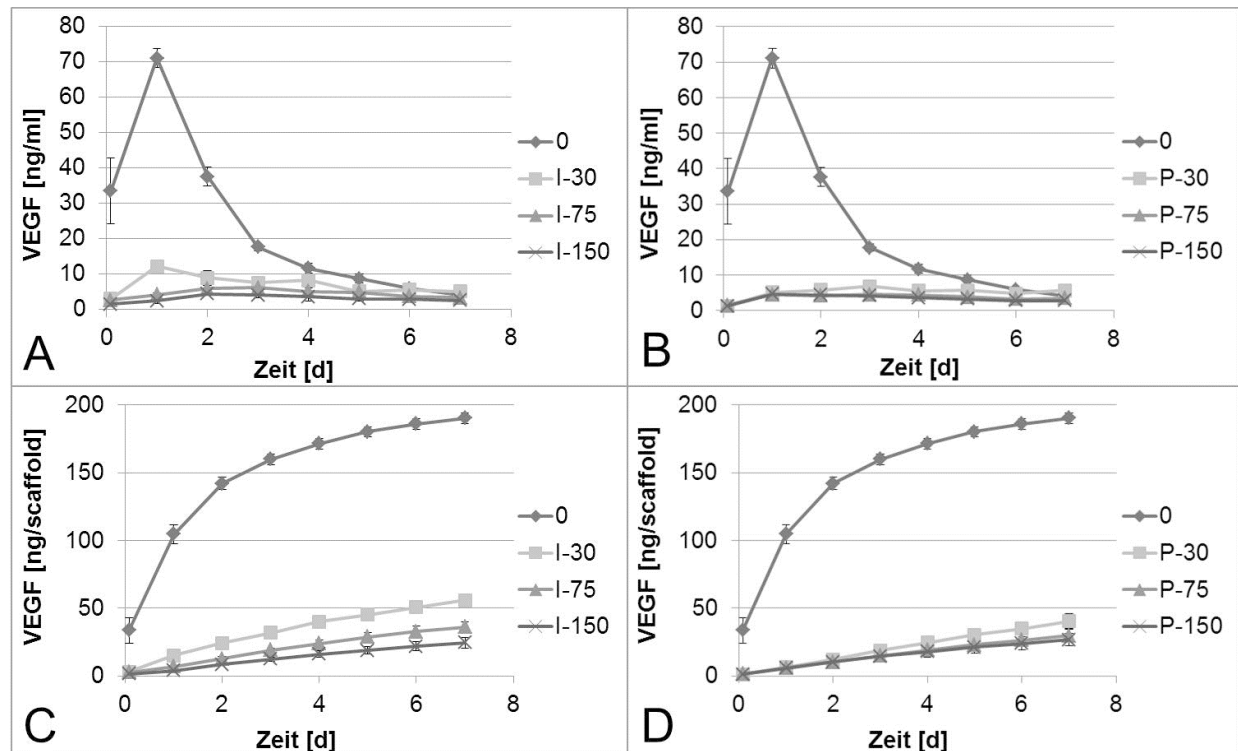


Abbildung 30: VEGF-Freisetzung von Heparin-freien und Heparin-modifizierten Scaffolds über 7 Tage. Beladung der Scaffolds mit 200 ng VEGF über Nacht; ungebundenes VEGF wurde durch Spülen entfernt. Die Freisetzung wurde unter Zellkulturbedingungen in 1 ml Freisetzungsmedium untersucht. Ein Wechsel des Medium wurde zuerst nach 2 h, dann alle 24 h durchgeführt und mittels ELISA quantifiziert (n=4, Mittelwert \pm Stabw). Beide Modifizierungen „insitu“ und „post“ hatten einen signifikanten Einfluss auf die Freisetzung; bei der kumulativen Freisetzung bestand zu jedem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zur Heparin-freien Variante (*p < 0,05). A) tägliche Freisetzung bei den „insitu“-modifizierten Varianten, B) tägliche Freisetzung bei den „post“-modifizierten Varianten, C) kumulative Freisetzung bei den „insitu“-modifizierten Varianten und D) kumulative Freisetzung bei den „post“-modifizierten Varianten.

Tendenziell zeigten die Ergebnisse der VEGF-Freisetzung, dass je mehr Heparin durch die Modifizierung an den Scaffolds gebunden wurde, desto geringer war die Menge an freigesetztem VEGF. Bei der Heparin-freien Variante wurde anfangs sehr viel, an späteren Zeitpunkten weniger freigesetzt, während bei den modifizierten Varianten eine verzögerte Freisetzung über den gemessenen Zeitraum zu erkennen war.

Wie unter 4.1.1 bereits beschrieben, kam es bei der Heparinbindung am Scaffold zu Unterschieden zwischen den verschiedenen Kollagenchargen. In Wiederholungsexperimenten zur VEGF-Freisetzung wurden starke Schwankungen festgestellt, welche sich in einer verminderten Menge an insgesamt freigesetztem VEGF aber auch in der täglichen Freisetzung aus Heparin-freien und Heparin-modifizierten Scaffolds widerspiegeln. Besonders traten die Abweichungen bei Scaffolds aus verschiedenen Kollagenchargen auf. Im Anhang werden die Ergebnisse der Wiederholungsversuche aufgelistet. Des Weiteren wurde die VEGF-Freisetzung mit

Heparin-modifizierten Scaffolds über 28 Tage unter Zellkulturbedingungen durchgeführt. Im Vergleich zu dem Experiment mit den Ergebnissen aus Abbildung 30, welches mit Scaffolds der Charge I-60 durchgeführt wurde, war die tägliche Freisetzung aus allen getesteten Varianten (Heparin-frei, „insitu“- und „post“-modifiziert) mit Scaffolds der Charge I-79 tendenziell geringer und nach 7 Tagen wurde somit kumulativ weniger freigesetzt. In diesem VEGF-Freisetzungsexperiment über 28 Tage wurde VEGF, im Vergleich zu Heparin-freien Scaffolds, ebenfalls verzögert aus „insitu“- und „post“-modifizierten Scaffolds freigesetzt. Bei den Heparin-modifizierten Scaffolds war die Freisetzung im Gegensatz zur Heparin-freien Variante über 28 Tage langanhaltend und relativ konstant.

Abbildung 31 A zeigt die absoluten Werte der VEGF-Freisetzung aus Heparin-freien und „insitu“-modifizierten Varianten über einen Zeitraum von 28 Tagen (links: ersten 7 Tage, rechts: über 28 Tage). Im Gegensatz zur Heparin-freien Variante, mit einem hohen „initial burst“ in den ersten zwei Tagen und eine kontinuierliche Abnahme der freigesetzten Menge über den Zeitraum von 28 Tagen, wurde nur bei I-30 ein geringer „initial burst“ nachgewiesen. Die Freisetzungskinetik der „insitu“-modifizierten Varianten zeichnete sich durch eine relativ konstant freigesetzte VEGF-Menge über 28 Tage aus. Bei I-30 war die freigesetzte VEGF-Menge tendenziell höher als bei I-75 und diese wiederum setzte etwas mehr VEGF frei als I-150. Scheinbar verzögert sich die VEGF-Freisetzung mit zunehmendem Heparinegehalt aus den Scaffolds.

Die absoluten Werte der VEGF-Freisetzung aus „post“-modifizierten Scaffolds sind in Abbildung 31 B dargestellt. Eine hohe initiale Freisetzung, wie bei der Heparin-freien Variante, war bei allen „post“-modifizierten Varianten nicht vorhanden. Die VEGF-Freisetzung aus den Heparin-modifizierten Varianten war über den Zeitraum von 28 Tagen relativ konstant, wohingegen sie bei der Heparin-freien Variante ab Tag 1 kontinuierlich abnahm. Die Variante P-30, mit dem geringsten Heparinegehalt, setzte mehr VEGF zu den gemessenen Zeitpunkten frei, als die Varianten P-75 und P-150 mit einer höheren Heparinmenge. Die Varianten P-75 und P-150 unterschieden sich in der täglichen VEGF-Freisetzung nur gering voneinander.

Im Gegensatz zu den „insitu“-modifizierten Varianten, war die VEGF-Freisetzung aus „post“-modifizierten Varianten geringer und die Varianten P-75 und P-150 unterschieden sich kaum in ihrer Freisetzung, während es bei den „insitu“-modifizierten Varianten größere Unterschiede in der Freisetzung zwischen den einzelnen Varianten gab.

In Abbildung 31 C und D ist die kumulative Freisetzung aus den Heparin-freien und Heparin-modifizierten Varianten zu sehen. Durch die „insitu“-Modifizierung mit Heparin (C) verzögerte sich die VEGF-Freisetzung aus den Scaffolds gegenüber der Heparin-freien Variante. Bei dieser wurden nach 28 Tagen 75 ng VEGF freigesetzt, welches 37,5% der initialen Menge entspricht, während es bei I-30 nur 55 ng VEGF (27,5% der initialen Menge) waren. Die Variante

I-75 setzte ähnlich viel frei wie I-30. Allerdings wurde mit 30 ng VEGF erheblich weniger VEGF aus der Variante, mit dem meisten Heparin Gehalt, I-150 freigesetzt. Bei den „post“-modifizierten Varianten verzögerte sich ebenso die VEGF-Freisetzung gegenüber der Heparin-freien Variante (D). Auch hier setzte die Variante, mit dem geringsten Heparin Gehalt, P-30 mit 35 ng VEGF, entspricht 17,5% der initialen Menge, am meisten von den „post“-modifizierten Varianten frei. Die Variante P-150 wies hingegen nur eine Freisetzung von 20 ng VEGF nach 28 Tagen auf.

Es konnte gezeigt werden, dass Heparin-freie Scaffolds VEGF sehr schnell freisetzen und die freigesetzte Menge ab Tag 1 kontinuierlich abnahm. Tendenziell konnte gezeigt werden, dass mit höherem Heparin Gehalt in den Scaffolds die VEGF-Freisetzung verzögert wurde. Die Kinetik war geprägt von einer konstanten und kontinuierlichen VEGF-Freisetzung. Allerdings setzten „insitu“-modifizierte Scaffolds mehr VEGF frei als „post“-modifizierte Scaffolds.

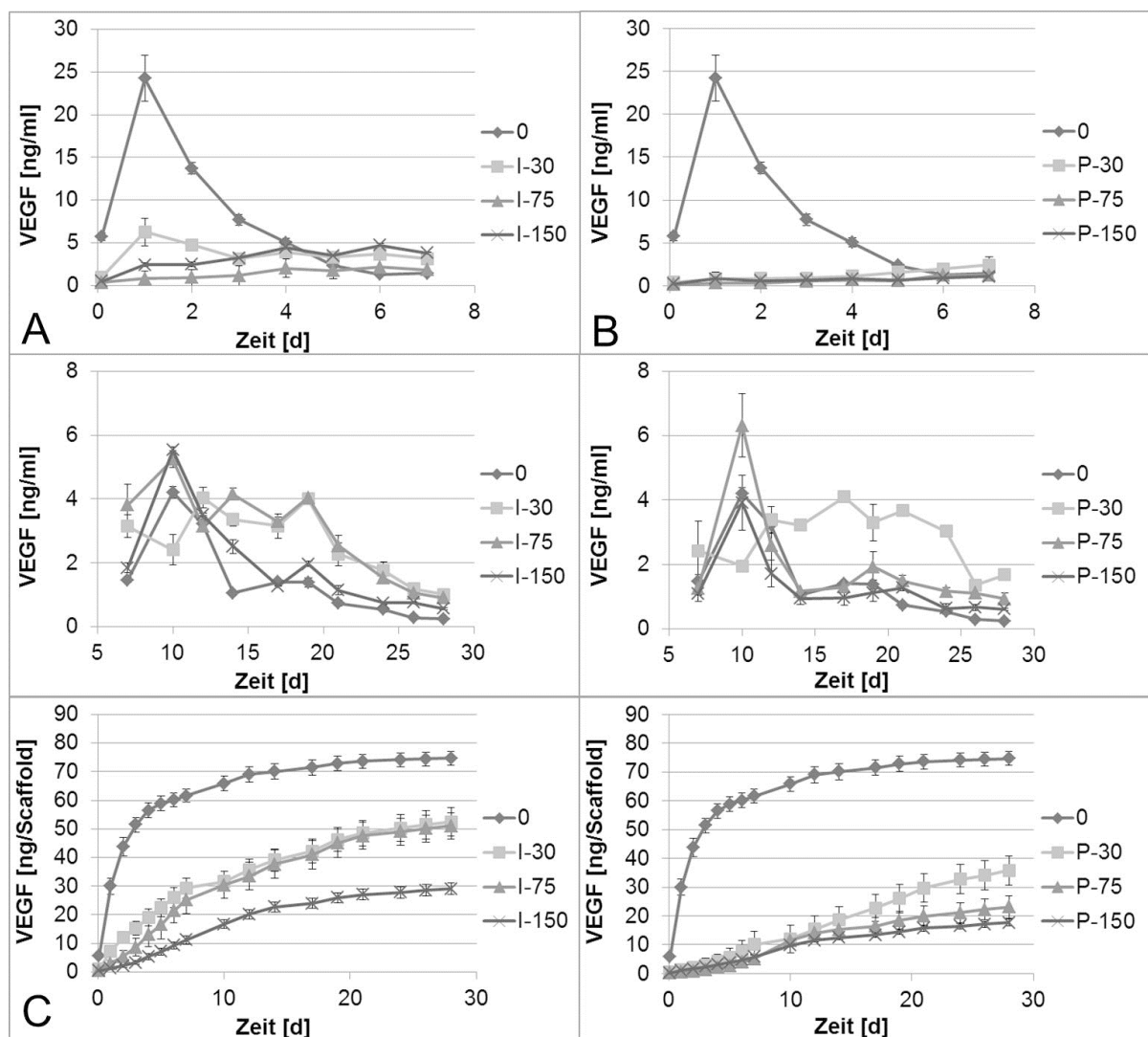


Abbildung 31: VEGF-Freisetzung aus Heparin-freien und Heparin-modifizierten Scaffolds über 28 Tage. Die Scaffolds wurden mit 200 ng über Nacht beladen und ungebundenes VEGF wurde durch Spülen entfernt. Die Freisetzung wurde unter Zellkulturbedingungen in 1 ml Freisetzungsmittel untersucht. Ein Wechsel des Mediums wurde zuerst nach 2h, dann alle 24 h durchgeführt und mittels ELISA quantifiziert

(n=4, Mittelwert \pm Stabw). Beide Modifizierungen „insitu“ und „post“ hatten einen signifikanten Einfluss auf die tägliche Freisetzung; bei der kumulativen Freisetzung bestand zu jedem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zur Heparin-freien Variante (*p < 0,05). A) tägliche Freisetzung bei den „insitu“-modifizierten Varianten (links: ersten 7 Tage, rechts: über 28 Tage), B) tägliche Freisetzung bei den „post“-modifizierten Varianten (links: ersten 7 Tage, rechts: über 28 Tage), C) kumulative Freisetzung bei den „insitu“-modifizierten Varianten und D) kumulative Freisetzung bei den „post“-modifizierten Varianten.

Bestimmung der biologischen Aktivität des freigesetzten VEGF

Neben der quantitativen Bestimmung des freigesetzten VEGF von Heparin-modifizierten Scaffolds und der Heparin-freien Variante aus den Versuchen (siehe 4.1.5) wurde dessen biologische Aktivität des freigesetzten VEGF in einem Endothelzellen-Proliferationsassay (siehe 3.8.2) getestet. Dabei wurde die mitogene Wirksamkeit des von den Scaffolds freigesetzten VEGF anhand der Zunahme der Zellzahl nach dreitägiger Inkubation nachgewiesen. Es zeigte sich, dass das freigesetzte VEGF zu allen gemessenen Zeitpunkten biologisch aktiv war.

Zusätzlich wurde eine VEGF-Kalibriergerade mitgeführt, bei der definierte Konzentrationen (im Bereich von 0-100 ng/ml) von VEGF dem Zellkulturmedium hinzugefügt wurden und anschließend die Zunahme der Zellzahl, nach dreitägiger Inkubation, bestimmt wurde.

In Abbildung 32 ist ersichtlich, dass die Zellzahl im Bereich von 0 bis 10 ng VEGF/ml linear ansteigt und nach einem Maximum bei 17 ng VEGF/ml tendenziell wieder abnimmt.

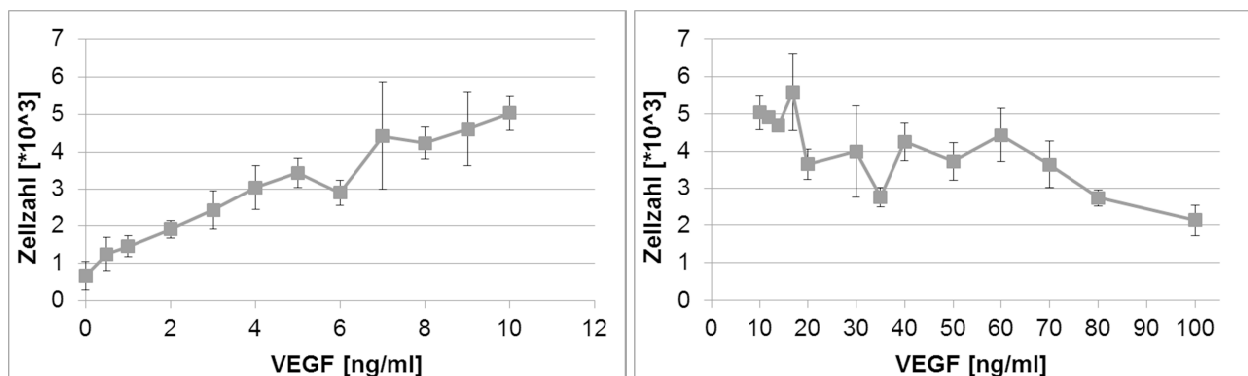


Abbildung 32: VEGF-konzentrationsabhängige Proliferation von HDMEC. Bestimmung der Proliferation anhand des DNA-Gehaltes der Zellen nach dreitägiger Inkubation in Zellkulturmedium mit verschiedenen VEGF-Konzentrationen (n=3, Mittelwert \pm Stabw).

Die Zunahme der Zellproliferation nach Inkubation in VEGF-haltigem FreisetzungsmEDIUM von Heparin-freien und Heparin-modifizierten Scaffolds (nach 24 h bzw. 7 Tagen) wird beispielhaft in Abbildung 33 gezeigt. Hierbei wurde die Zunahme der Zellzahl von Kontrollen (freigesetztes Medium von Scaffolds ohne VEGF-Beladung) auf den Wert 1 gesetzt und mit der Zunahme der Zellzahl von VEGF-haltigem Medium (freigesetztes Medium von Scaffolds mit VEGF) verglichen. Werte über 1 zeigten die mitogene Wirksamkeit des von den Scaffolds freigesetzten VEGF.

Für den frühen (nach 24 h) und den späteren Zeitpunkt (am Tag 7) wurde ersichtlich, dass das von allen Scaffoldvarianten freigesetzte VEGF biologisch aktiv war und die Zellproliferation förderte. Das nach 24 h entnommene Freisetzungsmedium führte, sowohl bei der Heparin-freien als auch bei den „insitu“-modifizierten Varianten, zu einer starken Steigerung der Zellzahl (Abbildung 33 A). Allerdings war die Zunahme der Zellproliferation, mit ca. 4,5 bei der Heparin-freien Variante und 3,8 bei der geringsten Heparinvariante (I-30), signifikant höher als bei den Varianten I-75 (mit 2,1) und I-150 (mit 1,7), welche einen höheren Heparingehalt aufwiesen. Das nach 7 Tagen entnommene Freisetzungsmedium führte zu einem deutlich geringeren Anstieg der Zellzahl bei der Heparin-freien Variante gegenüber den „insitu“-modifizierten Varianten. Signifikant unterschied sich die Variante I-30 (mit einem Wert von 2,5) gegenüber der Heparin-freien Variante (mit einem Wert von 1,3). Bei den Varianten I-75 und I-150 lag der Wert mit 2,1 ebenfalls höher als bei der Heparin-freien Variante.

Auch das von den „post“-modifizierten Varianten freigesetzte VEGF war sowohl nach 24 h als auch nach längerer Inkubationszeit von 7 Tagen immer noch biologisch aktiv. Abbildung 33 B zeigt die Zunahme der Zellproliferation der „post“-modifizierten Varianten. Das nach 24 h entnommene Freisetzungsmedium der Heparin-freien Variante steigerte signifikant die Zellzahl (mit einem Wert von 4,5) im Vergleich zu den „post“-modifizierten Varianten (mit Werten von 2,5 (P-30); 2,2 (P-75) und 2,8 (P-150)). Der Anstieg der Zellzahl nach Inkubation in entnommenem Freisetzungsmedium am Tag 7 war bei der Heparin-freien Variante (mit einem Wert von 1,3) ähnlich gering wie bei der höchsten Heparinvariante P-150, aber deutlich geringer (nicht signifikant) gegenüber den Varianten P-30 (mit einem Wert von 2,0) und P-75 (mit einem Wert von 2,1).

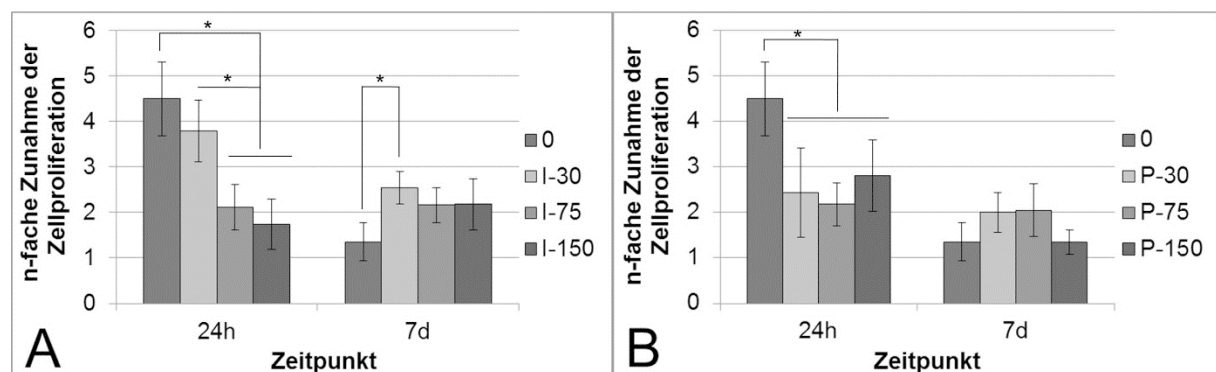


Abbildung 33: Biologische Aktivität des von Scaffolds freigesetzten VEGF zu den Zeitpunkten 24 h und 7 d. Angegeben wird die n-fache Zunahme der Zellzahl im Vergleich zu VEGF-freien Kontrollen. Der Anstieg der Zellzahl, gemessen anhand der DNA der Zellen nach dreitägiger Inkubation, wurde von den Kontrollen (Medium der Scaffolds ohne VEGF) auf den Wert 1 gesetzt und mit der Zunahme der Zellzahl, welche mit freigesetztem Medium von den Scaffolds mit VEGF inkubiert wurden, ins Verhältnis gesetzt. Ein Wert über 1 zeigt somit die Zunahme der Zellzahl aufgrund der biologischen Aktivität des freigesetzten VEGF an (n=4, Mittelwert \pm Stabw, *p < 0,05). A) „insitu“-modifizierte und B) „post“-modifizierte Scaffolds.

Biologische Aktivität des freigesetzten VEGF

Um die biologische Aktivität des VEGF aus Freisetzungsmedium nach längerer Inkubationsdauer (nach 7 Tagen) näher zu untersuchen, wurde die mitogene Aktivität auf Endothelzellen im Vergleich mit „frisch“ dazugegebenen VEGF getestet. Zusätzlich wurde der Einfluss von Heparin auf die biologische Aktivität des freigesetzten VEGF getestet.

Um die Kalibriergerade zu erstellen, wurden Zellen mit definierten VEGF-Konzentrationen (im Bereich von 0-7 ng VEGF/ml) kultiviert und die Zunahme der Zellproliferation bestimmt. Die so bestimmte Zunahme der Zellzahl, in Abhängigkeit der VEGF-Konzentration, wurde mit der Zunahme der Zellzahl, welche mit freigesetztem VEGF von den Scaffoldvarianten kultiviert wurden und die mittels ELISA quantifizierte freigesetzte Menge an VEGF, verglichen. Diese Vorgehensweise ist in Abbildung 34 schematisch dargestellt.

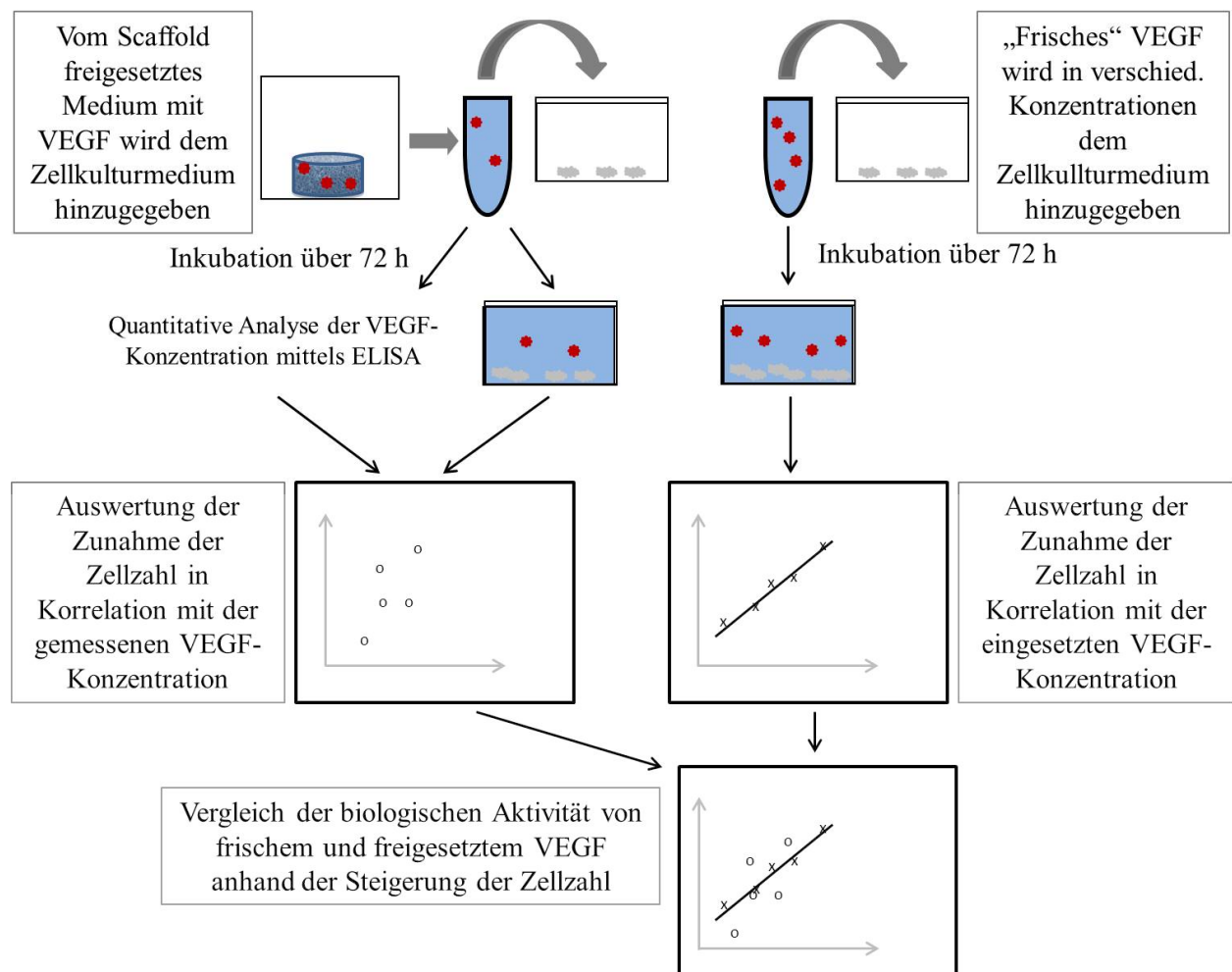


Abbildung 34: Schematische Darstellung zur Bestimmung der biologischen Aktivität von freigesetztem VEGF aus Heparin-freien und Heparin-modifizierten Varianten und des Einflusses der VEGF-Menge sowie der Heparin-Modifikation auf die Zunahme der Zellzahl durch Vergleich mit einer Kalibriergeraden mit definierten VEGF-Konzentrationen im Bereich von 0-7 ng/ml.

Der Vergleich der proliferationsfördernden Wirkung von frischem VEGF (Kalibriergeraden) mit der von den Scaffolds freigesetztem VEGF zeigt Abbildung 35. Dazu wurde die Steigerung der Zellproliferation mit entsprechender VEGF-Konzentration aus freigesetztem Medium am Tag 7 aufgetragen.

Während das freigesetzte VEGF der Heparin-freien Variante im Bereich von 2 ng/ml kaum einen Effekt auf die Zunahme der Zellproliferation hatte und im Vergleich zum „frischen“ VEGF (Kalibriergerade) eine verminderte Zunahme der Zellzahl aufwies, war das freigesetzte VEGF aus Heparin-modifizierten Varianten effektiver. Ein deutlicher Effekt war bei freigesetztem VEGF aus „insitu“-modifizierten Varianten auf die mitogene Aktivität zu erkennen. Hierbei führte das entnommene VEGF-Freisetzungsmedium zu einem stärkeren Anstieg der Zellproliferation gegenüber freigesetztem VEGF von Heparin-freien und „post“-modifizierten Varianten und frischem VEGF (die Werte lagen deutlich „oberhalb“ der Kalibriergeraden). Bei der Variante I-30 schien der Effekt am höchsten zu sein und die Zellzahl nahm, im Vergleich zur Zellzahl ermittelt mit der Kalibrierungsgeraden und einer gleichen VEGF-Konzentration von 2,5 ng/ml, zu.

Die biologische Aktivität des freigesetzten VEGF aus „post“-modifizierten Varianten war im Gegensatz zur Heparin-freien Variante erhöht und führte zu einer leicht gesteigerten Zunahme der Zellproliferation. Im Vergleich zu frischem VEGF hatte das entnommene VEGF im Freisetzungsmedium allerdings eine weniger proliferationsfördernde Wirkung.

Bei frisch dazugegebenem VEGF war die mitogene Aktivität des freigesetzten VEGF gegenüber der Heparin-freien Variante weniger aktiv. Bei den Heparin-modifizierten Varianten scheint das am Scaffold gebundene Heparin einen positiven Effekt auf die Erhöhung der Zellzahl durch das freigesetzte VEGF zu haben. Die „insitu“-Modifizierungen hatten dabei den größten Effekt und führten sogar zu einer gesteigerten Zunahme der Zellzahl im Vergleich zum „frischen“ VEGF.

Die unterschiedlichen Heparinkonzentrationen (30, 75 und 150 mg Heparin/g min. Koll.) der modifizierten-Scaffolds schienen keinen Einfluss auf die biologische Aktivität des entnommenen VEGF-haltigen Freisetzungsmedium zu haben.

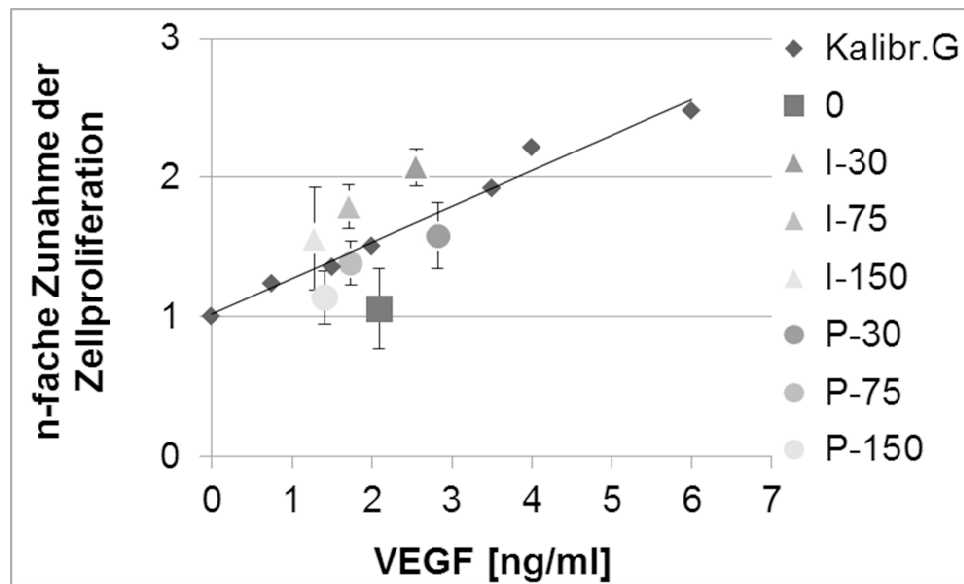


Abbildung 35: Biologische Aktivität des freigesetzten VEGF zum Zeitpunkt Tag 7 im Vergleich zu „frischem“ VEGF (Kalibriergeraden (Kalibr.G)). Die biologische Aktivität des „frischen“ VEGF wurde anhand der Zunahme der Zellproliferation in Gegenwart definierter VEGF-Konzentrationen, welche frisch dem Zellkulturmedium hinzugegeben wurden, bestimmt und mit der Zunahme der Zellproliferation ohne VEGF im Medium (wurde 1 gesetzt), verglichen ($n=4$, Mittelwert \pm Stabw). Daten aus dem in Abbildung 33 gezeigten Experiment.

4.2 Entwicklung von einem zentralen Depot in Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen

Für die Funktionalisierung der Scaffolds mit einem Wirkstoffdepot wurden verschiedene Komponenten (überwiegend biopolymere Hydrogelsubstanzen) mit dem Modellwachstumsfaktor VEGF-A₁₆₅ beladen und anschließend in das Innere der Scaffolds injiziert. Das Ziel dieser Funktionalisierung sollte sein, durch die unterschiedliche Zusammensetzung der Depots die Freisetzung des Wachstumsfaktors über einen längeren Zeitraum zu beeinflussen. Zur Etablierung eines Wirkstoffdepots wurden verschiedene Grundkomponenten (Heparin, Alginat, Hyaluronsäure und Methylcellulose) verwendet. Es wurden zudem auch Kombinationen aus diesen Materialien als Depot genutzt. *In vivo* soll das System aus Scaffold mit mineralisiertem Kollagen und Wirkstoffdepot chemoattraktiv auf Zellen aus der Umgebung wirken, um diese anzulocken und in das Scaffold migrieren zu lassen (siehe Abbildung 36), damit eine schnellere Defektheilung erfolgen kann. Dazu wurde im Labor getestet, ob bei einer Besiedlung der Scaffoldoberfläche mit Endothelzellen eine gerichtete Migration in Richtung eines gebildeten Wirkstoffgradienten im Scaffold erfolgt.

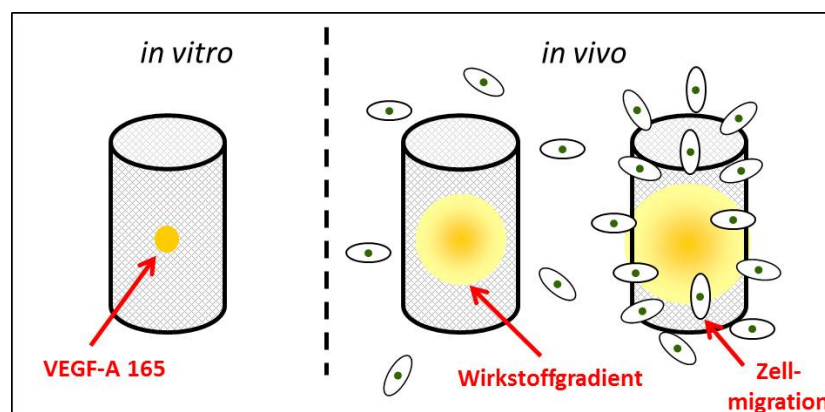


Abbildung 36: Schematische Darstellung der Freisetzung des Modellfaktors VEGF aus einem zentralen Wirkstoffdepot *in vivo*, welches *in vitro* in ein Scaffold aus mineralisiertem Kollagen injiziert wurde.

4.2.1 Etablierung eines zentralen Wirkstoffdepots

Als Komponenten für ein zentrales Wirkstoffdepot wurden Materialien ausgewählt (Heparin, Alginat, Hyaluronsäure und Methylcellulose), welche bereits in Drug Delivery-Systemen zur Anwendung kommen. Zunächst wurde untersucht, wie viel Lösung in ein Scaffold aus mineralisiertem Kollagen mit den Maßen 8 mm Höhe und 6 mm im Durchmesser injiziert werden konnte, damit das Depot im Inneren nicht zu klein oder zu gross wird. Es wurden Volumina im Bereich von 5 bis 30 μl getestet (siehe Abbildung 37). Aufgrund der Größe und Form eines verwendeten Volumens von 15 μl im Scaffoldlängsschnitt wurde diese Menge für die weiteren Versuche ausgewählt.

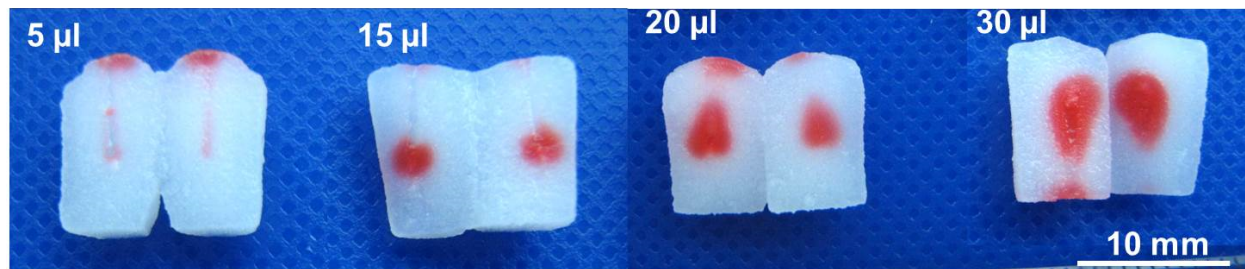


Abbildung 37: Gefärbtes Alginatgel, injiziert in Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen. Menge des injizierten Alginates von 5 bis 30 µl. Scaffolds hatten eine Höhe von 8 mm und einen Durchmesser von 6 mm.

Nachweis der Depotkomponenten im Scaffold

Die in der Arbeit verwendeten Depot-Varianten wurden in Gruppen gegliedert (siehe Tabelle 23), um die folgenden Ergebnisse systematisch darstellen zu können. In der *Gruppe 2* wurden die Hydrogelkomponente Alginat und Kombinationen mit dieser zusammengefasst. Bei diesen war eine Vernetzung der Grundkomponente Alginat mit einer Calciumchlorid-Lösung möglich, um das Depot zu stabilisieren.

Tabelle 23: Einteilung der injizierten Wirkstoffkomponenten in Gruppen

Einteilung	Hydrogelkomponenten/Lösung	Vernetzung
Kontrollvariante mit injiziertem VEGF ohne Depot	VEGF in PBS/BSA	keine
Gruppe 1	Heparin (1 mg/ml)	keine
	1% Hyaluronsäure	
	1% Methylcellulose	
Gruppe 2	1% Alginat	Vernetzung der Alginatkomponente mit einer Calciumchlorid-Lösung nach der Injizierung in das Scaffold
	1% Alginat + Heparin (1 mg/ml)	
	1% Alginat + 1% Hyaluronsäure	
	1% Alginat + 1% Methylcellulose	

Um die in die Scaffolds injizierten Depotkomponenten nachzuweisen, wurden diese mit Hilfe verschiedener Färbereagenzien angefärbt. Hierbei wurden die Scaffolds mit dem jeweiligen Depot beladen und über einen Zeitraum von bis zu 28 d im Freisetzungsmedium gelagert, welches wie auch bei den VEGF-Freisetzungsversuchen zuerst nach 2 h, dann alle 24 h gewechselt wurde. Für den Nachweis der Depotkomponenten wurden diese mit drei verschiedenen Färbereagenzien behandelt (siehe Tabelle 24).

Tabelle 24: Übersicht der verwendeten Färbelösungen zum Nachweis der Depotkomponenten

Färbelösung	Hydrogel-/Depotkomponenten	Abkürzung
DMMB-Lösung	Heparin	Hep
	1% Alginat	Alg
	1% Alginat + Heparin	Alg + Hep
Alcianblau-Lösung	1% Hyaluronsäure	HYA
Alcianblau-/DMMB-Lösung	1% Alginat + Hyaluronsäure	Alg + HYA
Chlorzinkjod-Lösung	1% Methylcellulose	MC
	1% Alginat + 1% Methylcellulose	Alg + MC

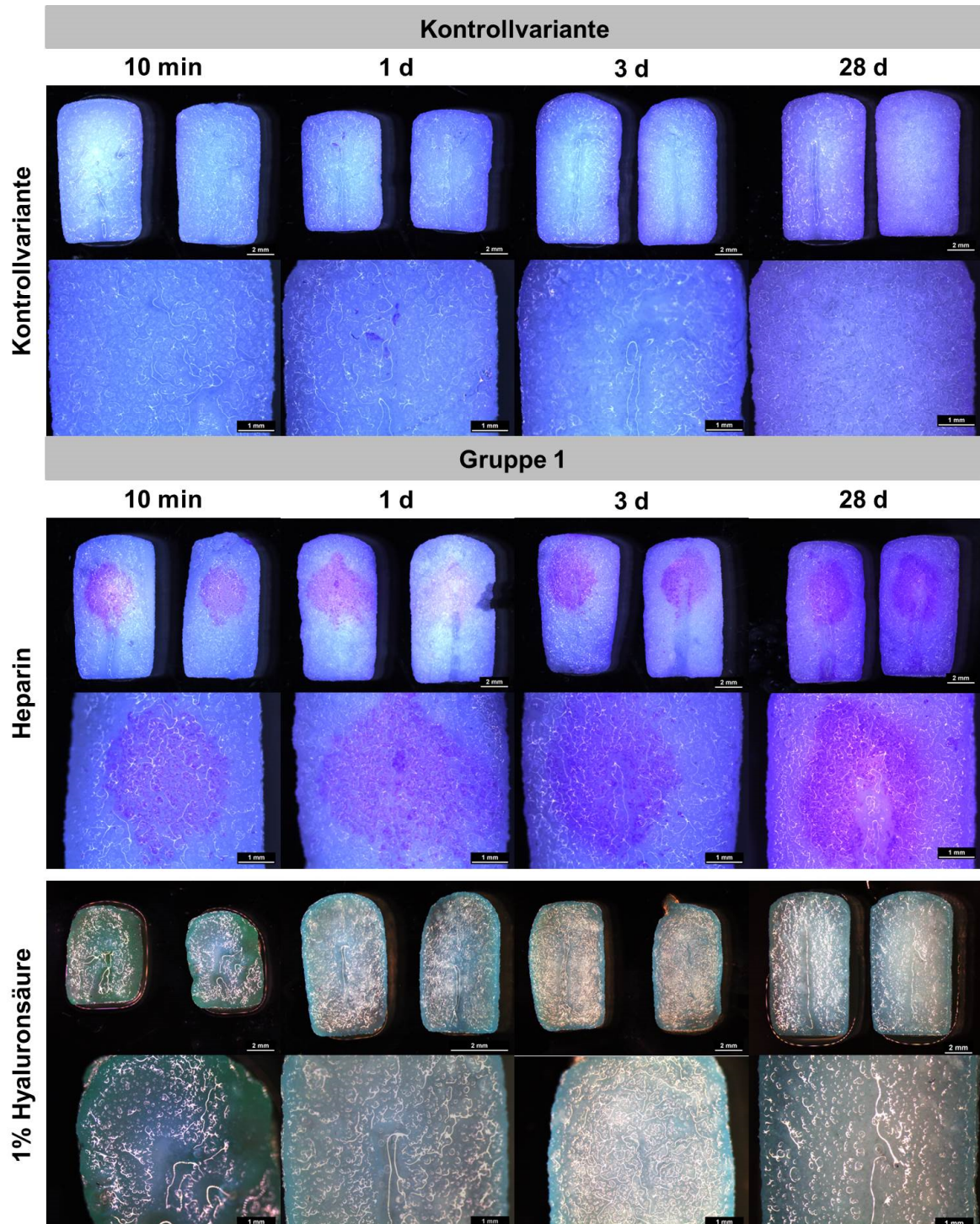
Die **Kontrollvariante** (ohne Depotkomponente; in diesem Versuch wurde nur eine Lösung aus PBS/BSA ohne VEGF injiziert) wurde mit allen drei Färbereagenzien angefärbt und diente als Negativ-Kontrolle. Zur besseren Übersicht ist in Abbildung 38 nur die mit DMMB gefärbte Kontrollvariante dargestellt.

In der *Gruppe 1* zeigte sich, dass **Heparin** über den gesamten Zeitraum am Kollagenscaffold gebunden hatte und mit einer gleichen Intensität nachweisbar war. **Hyaluronsäure** wurde nur schwach mit Alcianblau angefärbt und war schwer nachweisbar. 10 min und 1 d nach Injektion war die Komponente noch sichtbar, während diese nach 3 d nur noch schwach detektierbar und nach 28 d nicht mehr nachweisbar war. Durch die fehlende Vernetzung von HYA diffundierte diese vermutlich nach längerer Inkubationsdauer aus dem Scaffold und scheint, im Gegensatz zum Heparin, nicht am mineralisierten Kollagen zu binden. Durch die Färbung mit Chlorzinkjod wurde **Methylcellulose** stark dunkelbraun gefärbt. Allerdings färbte die Lösung auch das Kollagen/Mineral des Scaffolds an (nicht dargestellt), so dass hier keine Aussage zum Nachweis der Komponente möglich war.

In der *Gruppe 2* wurde die Komponente **Alginat** mittels DMMB-Lösung angefärbt. Alginat war 10 min, 1 d und 3 d nach Injektion in das Scaffold deutlich sichtbar. Nach 28 Tagen war die Färbung allerdings schwächer und deutete auf ein Auflösen und Herausdiffundieren des Alginate aus dem Scaffold hin. Bei der Kombination von **Alginat + Heparin** konnten die Komponenten mittels DMMB bis zu 28 Tagen nach Injektion nachgewiesen werden. Allerdings färbt DMMB auch Heparin stark an, wodurch eine Differenzierung zwischen Alginat und Heparin nicht möglich war. Auch bei der Kombination **Alginat + Hyaluronsäure**, bei dem die Komponenten mit Alcianblau/DMMB angefärbt wurden, war eine Differenzierung von Alginat und Hyaluronsäure nicht möglich. Es wurde mit DMMB für 10 min nachgefärbt, um die bereits vorhandene Alcianblau-Färbung zu verstärken. So konnte gezeigt werden, dass Alginat + Hyaluronsäure auch noch nach längerer Inkubation nachweisbar waren, auch wenn die Intensität der Färbung am Tag 28 schwächer und nur noch diffus darstellbar war. Hierbei schien ein Teil des Depots aus dem Scaffold herausdiffundiert zu sein. Des Weiteren sind die Komponenten in den Bildern mit einer Alcianblau- und anschließenden DMMB-Färbung an der Einstichstelle des

Scaffolds (Unterseite) zu erkennen.

Die Varianten Alg + HYA und Alg + MC waren viskoser als Alg/Alg + Hep, dadurch konnte ein „Nachlaufen“ der Komponenten nach dem Injizieren mit der Pipette nicht verhindert werden, so dass ein geringer Teil im Einstichkanal bzw. an der Unterseite der Scaffolds zu finden war. Beim Nachweis von **Alginat + Methylcellulose** mit Chlorzinkjod kam es, wie bei der Färbung von Methylcellulose, zu einer starken Anfärbung des gesamten Scaffolds (nicht dargestellt), was eine Aussage über das Depot erschwerte.



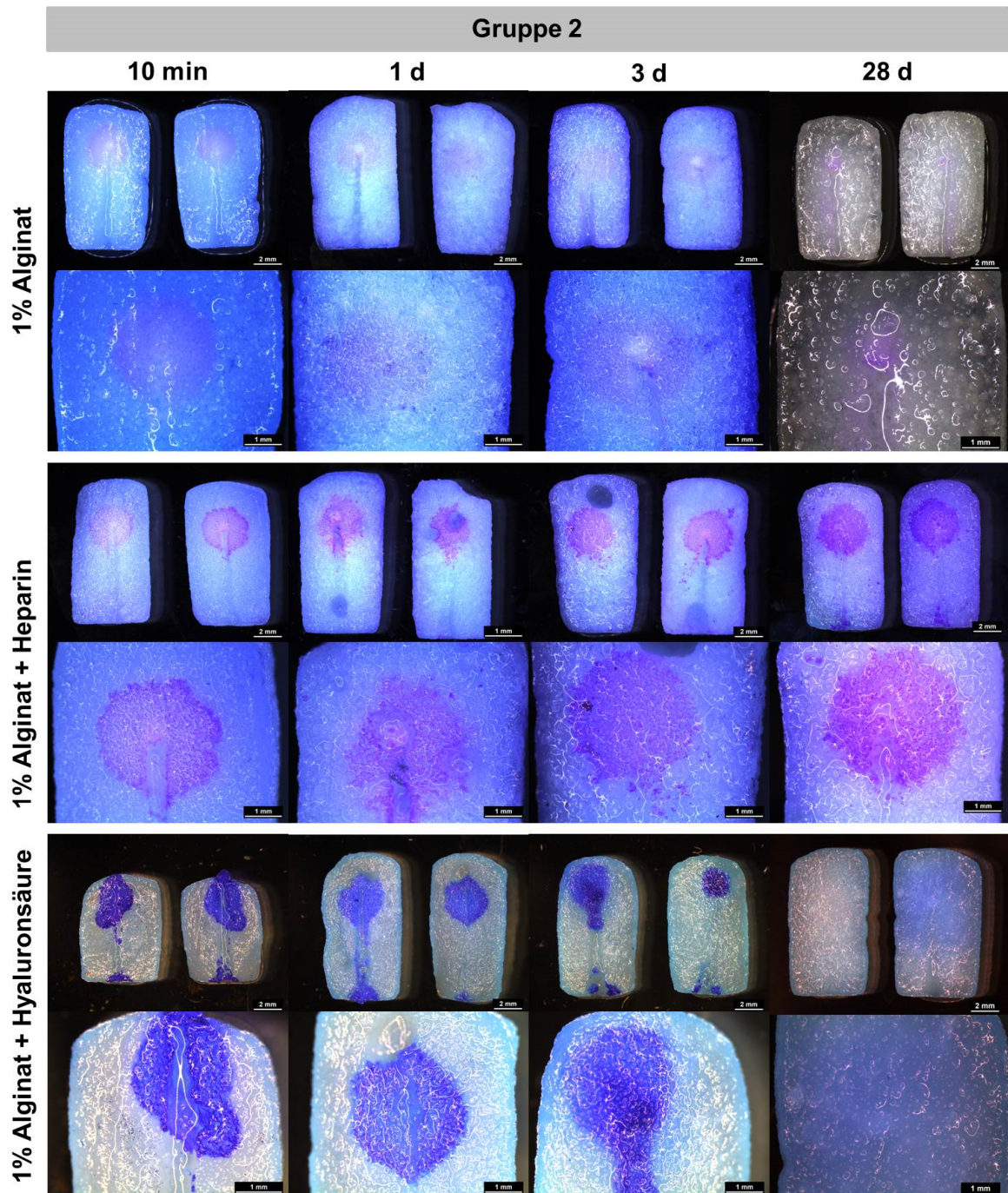


Abbildung 38: Färbung der verschiedenen Depotkomponenten mit DMMB und Alcianblau. Zeitpunkte nach 10 min, 1, 3 und 28 d. In den oberen Bildreihen sind jeweils beide Scaffoldhälften, in den unteren Bildreihen nur eine Hälfte bei höherer Vergrößerung dargestellt.

Die unterschiedlichen Depotkomponenten, injiziert in das Scaffold aus mineralisiertem Kollagen, zeigten eine unterschiedliche Stabilität über 28 Tage. Hierbei waren die Varianten **Hep** und **Alg + Hep** über einen Zeitraum von 28 Tagen ähnlich stabil und ließen sich mit der DMMB-Färbung sehr gut detektieren. Wie zuvor nachgewiesen, ist das auf die sehr gute Bindung von Heparin am Scaffold zurückzuführen. Die Kombination von **Alginat + Hyaluronsäure** war auch nach 28 Tagen noch nachweisbar, auch wenn die Intensität der Färbung über die Kultivierungsdauer

abnahm. Vermutlich stabilisierte die Kombination aus Alginat und Hyaluronsäure das zentrale Depot. Die Varianten **Alg** und **HYA** schienen während der Inkubationsdauer aus dem Scaffold herausdiffundiert zu sein, was durch die schwächer werdende Färbung der Komponenten ersichtlich wurde. Hierbei war allerdings die Färbung nicht optimal. Die Komponenten **Methylcellulose** und **Alginat + Methylcellulose** konnten durch die starke Wechselwirkung der Färbereagenzen mit dem Scaffold nicht dargestellt werden. Die Ergebnisse werden anhand der Intensität der Färbung der verschiedenen Wirkstoffe in Tabelle 25 zusammengefasst präsentiert.

Tabelle 25: Zusammenfassung der Ergebnisse zum Nachweis der einzelnen Komponenten, injiziert in Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen, zu verschiedenen Zeitpunkten

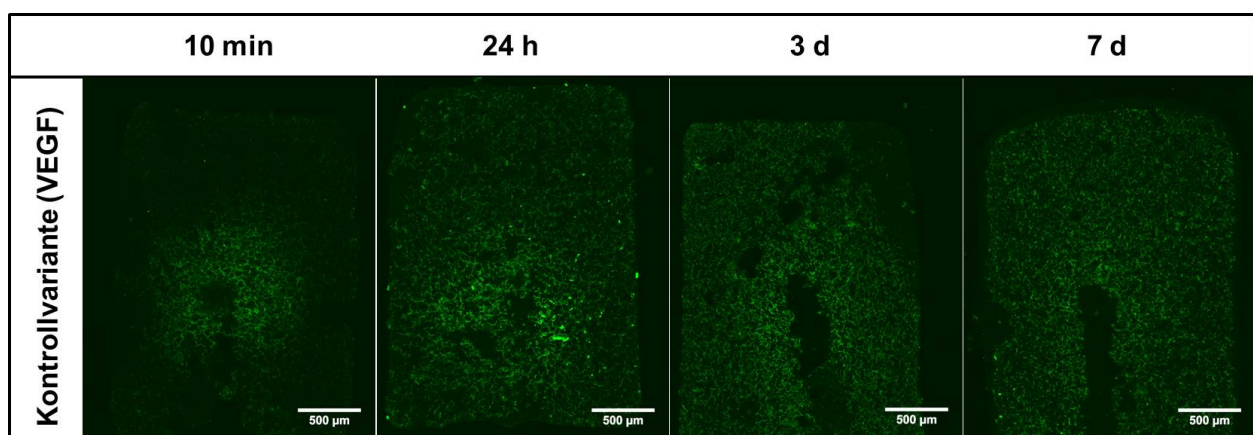
	10 min	1 Tag	3 Tage	28 Tage
Gruppe 1				
Hep	+++	+++	+++	+++
HYA	+	+	+/-	-
MC	-	-	-	-
Gruppe 2				
Alg	++	++	++	+
Alg + Hep	+++	+++	+++	+++
Alg + HYA	+++	+++	+++	+
Alg + MC	-	-	-	-
Legende:	+++	++	+	-
	Sehr gut nachweisbar	Gut nachweisbar	Kaum nachweisbar	Nicht nachweisbar

4.2.2 Bildung eines Wirkstoffgradienten aus zentralen Depots unterschiedlicher Zusammensetzung

Um die Bildung eines Wirkstoffgradienten aus injizierten Depots in Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen zu untersuchen, wurde Fluoreszenz-markiertes VEGF (FITC-VEGF) allein (Kontrolle) bzw. mit verschiedenen Depotkomponenten in das Scaffold injiziert und bis zu 7 Tage inkubiert. Nach 10 min, 24 h, 3 und 7 d wurde an Scaffoldlängsschnitten mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht, inwieweit der Wachstumsfaktor aus dem Depot freigesetzt wurde und sich ein Wirkstoffgradient ausgebildet hatte. Anhand der Intensität der Fluoreszenzfärbung konnte qualitativ auf die im Scaffold noch vorhandene Menge an FITC-VEGF geschlossen werden. War diese Intensität an der Injektionsstelle im Inneren des Scaffolds kräftiger als an den Außenseiten, so hatte sich ein Wirkstoffgradient gebildet. Über einen Zeitraum von 7 Tagen konnten bei den Varianten Alg und Alg + Hep die Bildung eines Wirkstoffgradienten nachgewiesen werden, bei dem die Intensität der Färbung an der Injektionsstelle über den Zeitraum kaum schwächer wurde.

Abbildung 39 zeigt die Verteilung von FITC-VEGF innerhalb der Scaffolds mit ausgewählten Depotvarianten (Kontrolle, Alg, HYA, MC und Alg + Hep) und zu verschiedenen Zeitpunkten. Bei der **Kontrollvariante** konnte nach 10 min der injizierte Wirkstoff an der Einstichstelle detektiert werden. Nach 24 h war der Wirkstoff im gesamten Scaffold verteilt, wobei die Injektionsstelle anhand der stärkeren Intensität noch zu erkennen war. Nach 3 und 7 Tagen war das VEGF im Scaffold homogen verteilt. Vermutlich wurde der Großteil des eingesetzten VEGF aus dem Scaffold freigesetzt. An der Injektionsstelle befand sich keine erhöhte VEGF-Konzentration mehr.

Im Gegensatz zur Kontrollvariante war bei der Hydrogelvariante **Alg** auch nach 24 h, 3 und 7 d eine hohe Intensität der Färbung an der Injektionsstelle zu sehen. Ein Teil des freigesetzten VEGF diffundierte gleichmäßig innerhalb des Scaffolds, welches anhand der helleren Scaffoldstruktur, im Vergleich zur dunklen Struktur 10 min nach der Injektion, zu sehen war. Auch bei der Variante **HYA** bildete sich im Gegensatz zur Kontrollvariante ein Wirkstoffgradient aus, der nach 3 Tagen noch stabil zu sein schien. Nach 7 Tagen hatte sich dieser aufgelöst und das VEGF war homogen im Scaffold verteilt. Ein ähnliches Bild war für die Variante **MC** zu erkennen. Bei der Variante **Alg + Hep** hatte sich im Vergleich zur Kontrollvariante ein Wirkstoffgradient gebildet, der auch nach 7 Tagen noch vorhanden war. Wie auch bei allen anderen Varianten diffundierte ein Teil des eingesetzten VEGF nach 24 h innerhalb des Scaffolds, welches anhand der helleren Scaffoldstruktur, im Vergleich zum 10 min-Zeitpunkt, zu beobachten war. Werden die beiden Varianten Alg und Alg + Hep miteinander verglichen, bei welchen der Wirkstoffgradient über einen Zeitraum von 7 Tagen stabil zu sein schien, scheint die Intensität der Färbung im Zentrum bei der Variante Alg + Hep intensiver zu sein. Dies deutet auf eine höhere Konzentration an noch vorhandenem VEGF hin, welches noch nicht ins Medium freigesetzt worden war oder sich im Scaffold verteilt hatte.



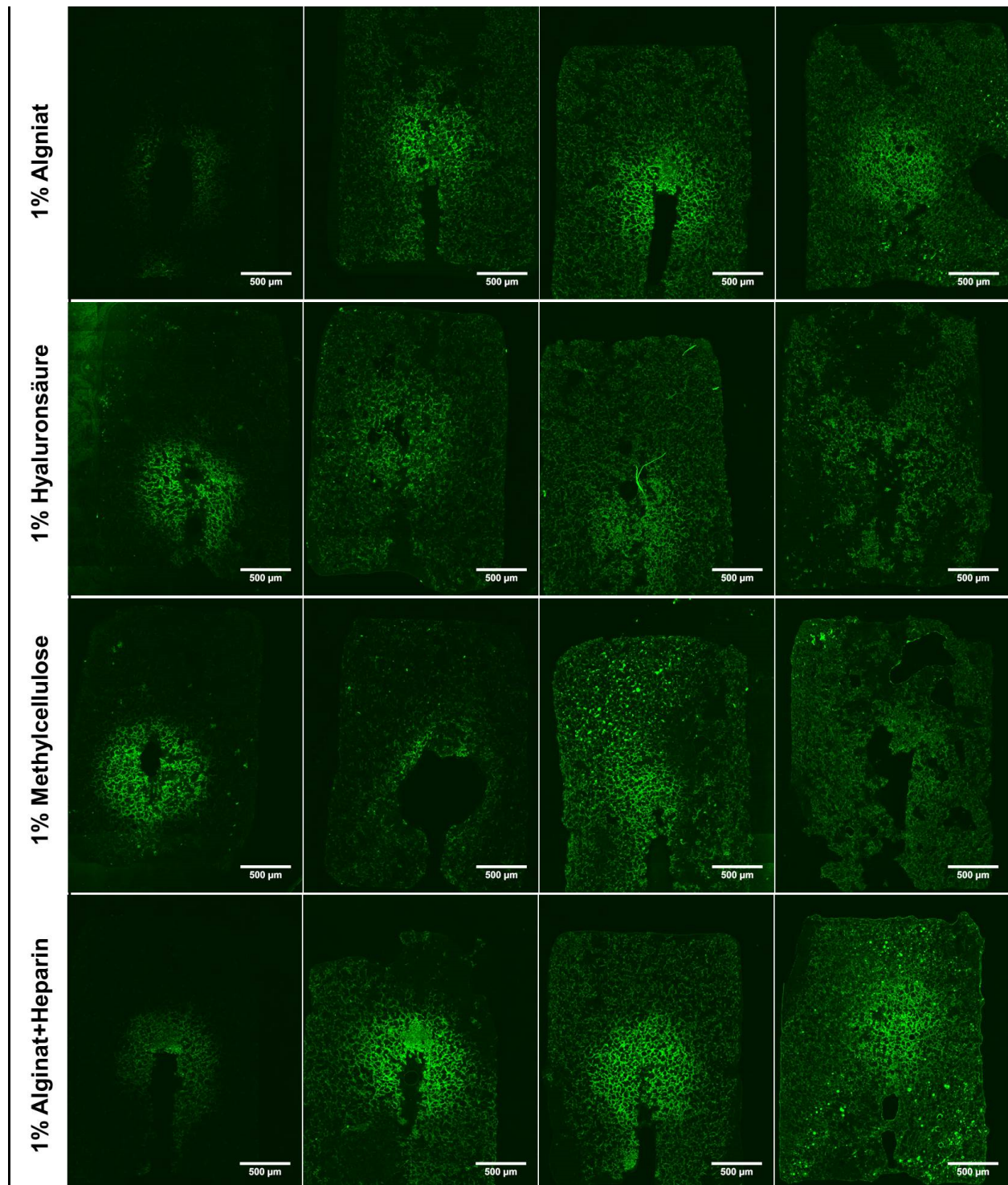


Abbildung 39: Ausbildung eines VEGF-Gradienten innerhalb von Scaffolds, in welche verschiedene Depotvarianten injiziert wurden. Verwendung von FITC-VEGF zur optischen Auswertung von Scaffoldhälften nach Injizierung eines Depots und Inkubation von 10 min, 24 h, 3 und 7 d.

4.2.3 VEGF-Freisetzung aus den Wirkstoffdepots

Die VEGF-Freisetzung aus Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen mit injizierten Depots wurde über einen Zeitraum von 27 Tagen untersucht. Die dazugehörigen Werte zur absoluten und kumulativen VEGF-Freisetzung sind im Anhang angegeben.

In Abbildung 40 ist die tägliche Freisetzung von VEGF über 7 Tage (A), absolute Freisetzung ab Tag 7 bis Tag 27 (B) und die kumulative Freisetzung über 27 Tage (C) aus Scaffolds mit injizierten Depotkomponenten dargestellt. Die unterschiedlichen Varianten zeigten jede für sich ein charakteristisches Freisetzungsprofil.

Die **Kontrollvariante** (VEGF ohne Depotkomponente) wies einen starken „initial burst“ mit rund 57 ng/ml VEGF am Tag 1 auf. Die Varianten der *Gruppe 1* (Hep, HYA und MC) zeigten jeweils ein unterschiedliches Freisetzungsverhalten. Während bei der Variante mit injiziertem **Heparin** kein „initial burst“ und eine konstant stark verzögerte Freisetzung zu erkennen war, zeigte die Variante **HYA** eine höhere initiale Freisetzung. Bei der Variante **MC** war im Gegensatz zur Kontrollvariante der „initial burst“ zeitlich um 24 h verschoben, setzte aber ähnlich wie die Kontrollvariante viel VEGF und damit mehr als bei der Variante Hep und HYA frei (VEGF-Freisetzung: Hep < HYA < MC). Die Freisetzung von VEGF aus der Variante mit Heparin war über die 7 Tage relativ konstant, während diese bei HYA und MC abnahm.

In der *Gruppe 2* (Alg, Alg + Hep, Alg + HYA und Alg + MC) zeigte die Variante **Alg + Hep** keinen „initial burst“ mit einer verzögerten VEGF-Freisetzung über 7 Tage, ähnlich der Variante Hep aus Gruppe 1. Im Gegensatz zu der Variante Alg + Hep, wiesen die Varianten **Alg**, **Alg + HYA** und **Alg + MC** einen „initial burst“ auf und die freigesetzte VEGF-Menge nahm über den gemessenen Zeitraum von 7 Tagen ab. Die Kombination von Alginat mit Hyaluronsäure/Methylcellulose schien zumindest im Vergleich zur Variante MC (ohne Alginat) die initial freigesetzte Menge deutlich zu verringern.

In Abbildung 40 B) ist die absolute Freisetzung von VEGF aus den verschiedenen Depots über einen Zeitraum von 27 Tagen dargestellt. Bei der **Kontrollvariante** nahm die freigesetzte VEGF-Menge kontinuierlich ab und erreichte mit 2 ng VEGF/ml am Tag 27 das Minimum. Die Komponenten der *Gruppe 1* unterschieden sich hinsichtlich der Freisetzung. Während die Menge an freigesetztem VEGF aus der Variante mit injiziertem **Heparin** bis zum Tag 12 kontinuierlich zunahm und dann bis Tag 27 mit 12 ng VEGF/ml konstant blieb, nahm die freigesetzte VEGF-Menge bei den Varianten **HYA** und **MC** bis Tag 27 kontinuierlich ab.

In der *Gruppe 2* wies die Variante **Alg + Hep** ein sehr ähnliches Freisetzungsprofil, mit kontinuierlich ansteigender Menge an freigesetztem VEGF und einem konstanten Verlauf ab Tag 12, wie die Variante Hep aus Gruppe 1 auf. Die Freisetzung von VEGF nahm bei den Varianten **Alg**, **Alg + HYA** und **Alg + MC** über den gemessenen Zeitraum tendenziell ab, wobei die Variante Alg + MC am Tag 27 ähnlich wenig VEGF freisetzte wie die Kontrollvariante.

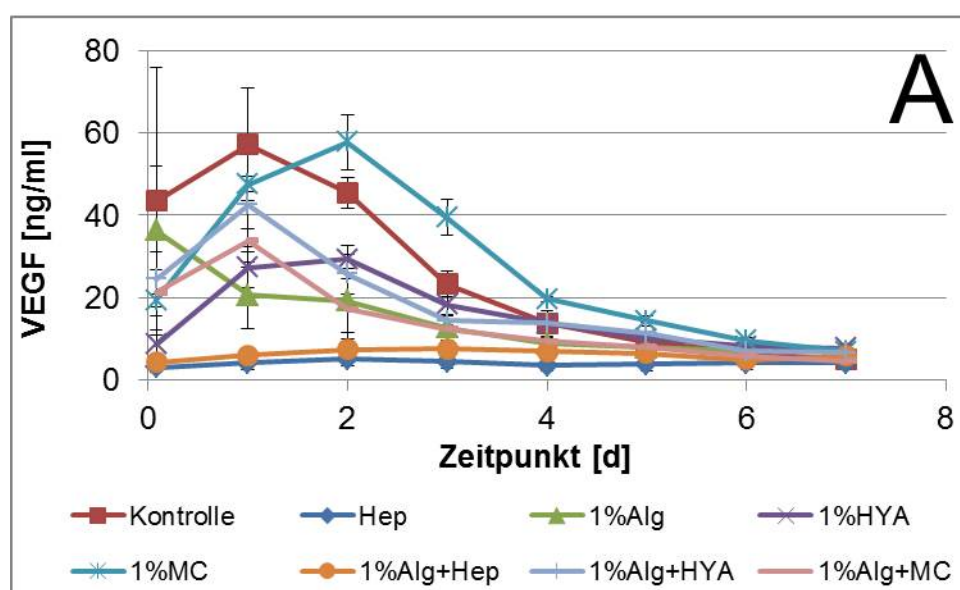
Zu jedem Zeitpunkt wurde aus allen Varianten der Gruppe 1 und 2 sowie der Kontrollvariante VEGF freigesetzt.

Die kumulative Freisetzung von VEGF aus der Kontrollvariante und den Varianten der Gruppe 1 und 2 sind in Abbildung 40 C dargestellt. Die Scaffolds wurden mit jeweils 400 ng VEGF bela-

den und nach der Kultivierungszeit wurden minimal 27% und maximal 67% der anfänglichen Menge freigesetzt. Aus der **Kontrollvariante** wurde VEGF nur leicht verzögert und mit 57% bis Tag 27 mit am meisten VEGF freigesetzt. In *Gruppe 1* der Depot-Varianten wurde ähnlich viel VEGF aus den Varianten **HYA** und **MC** freigesetzt, wobei HYA weniger (47%) und MC mehr (67%) als die Kontrollvariante freisetzte. Das Freisetzungsprofil war gekennzeichnet durch eine anfänglich schnelle und ab Tag 7 relativ konstant verzögerte Freisetzung. Bei der Variante **Heparin** wurde hingegen VEGF langanhaltend und verzögert freigesetzt, so dass sich insgesamt nur 27,5% der ursprünglich eingesetzten Menge aus dem Scaffold herauslösten.

In *Gruppe 2* der Hydrogel-Varianten zeigte **Alg + Hep** eine verzögerte und langanhaltende Freisetzung, ähnlich der Variante Hep aus Gruppe 1. Allerdings war die insgesamt freigesetzte Menge an VEGF etwas höher als bei Hep und lag bei 35% der initial eingesetzten Menge. Die Hydrogelvarianten **Alg** und **Alg + HYA** setzten über 27 Tage im Vergleich zur Variante Alg + Hep mehr VEGF (48%) frei. Allerdings wurde eine ähnliche Menge an VEGF aus **Alg + MC** freigesetzt wie aus der Variante Alg + Hep. Im Gegensatz zu Alg + Hep war das Freisetzungsprofil der Varianten Alg, Alg + HYA und Alg + MC durch eine innerhalb der ersten 7 Tage schwach verzögerte und anschließend konstante Freisetzung gekennzeichnet, wobei bei der Variante MC im Vergleich zu Alg und Alg + HYA nur noch sehr wenig VEGF ab Tag 8 freigesetzt wurde.

Eine Zusammenfassung der unterschiedlichen VEGF-Freisetzungen aus Depots und Hydrogel-Depots, injiziert in Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen, ist in Tabelle 26 dargestellt. Die Ergebnisse der Wiederholungsexperimente befinden sich im Anhang.



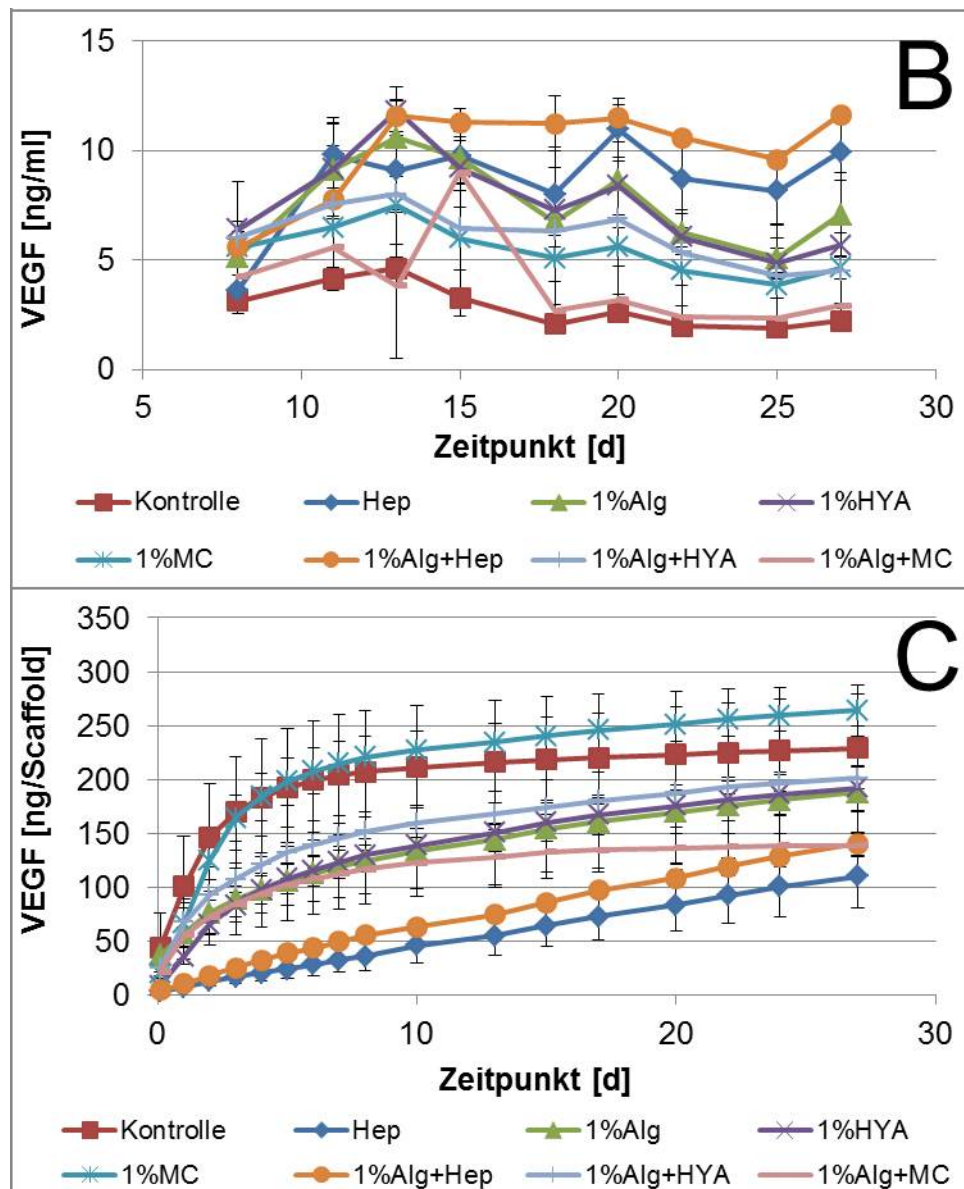


Abbildung 40: VEGF-Freisetzung aus Scaffolds mit zentralem Wirkstoffdepot. Einsatz von 400 ng VEGF pro Scaffold, welches zusammen mit einer Lösung bzw. Hydrogelkomponenten injiziert wurde. Als Kontrolle diente injiziertes VEGF ohne Depotkomponenten. Die Freisetzung wurde unter Zellkulturbedingungen in 1,5 ml Freisetzungsmedium untersucht. Ein Wechsel des Mediums wurde zuerst nach 2 h, dann alle 24 h durchgeführt und mittels ELISA quantifiziert ($n=3$, Mittelwert \pm Stabw). Varianten mit einem Depot bzw. Hydrogeldepot hatten einen signifikanten Einfluss auf die absolute und kumulative Freisetzung (* $p < 0,05$). A) tägliche Freisetzung über 7 Tage, B) absolute Freisetzung vom Tag 7 bis zu Tag 27, C) kumulative Freisetzung über 27 Tage

Tabelle 26: Übersicht zum VEGF-Freisetzungsverhalten aus Depots und Hydrogeldepots, injiziert in Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen

	Initiale FS	Langanhaltende FS	Freisetzungsverhalten über 28 Tage
Kontrollvariante	- (hohe)	- (keine)	Schnelle FS, kontinuierliche Abnahme der freigesetzten Menge
Gruppe 1			
Hep	+++	+++	Kontinuierlich, konstant verzögerte FS
HYA	+	+	Leicht verzögerte FS
MC	+	+	Leicht verzögerte FS
Gruppe 2			
Alg	++	++	Verzögerte FS, stetig leichte Abnahme
Alg + Hep	+++	+++	Kontinuierlich, konstant verzögerte FS
Alg + HYA	+	+	Leicht verzögerte FS
Alg + MC	+	-	Leicht verzögerte FS, schnelle Abnahme

Wie zuvor unter 4.1 erwähnt, gab es bei den in diesem Abschnitt beschriebenen Versuchen auch starke Schwankungen der Ergebnisse in der VEGF-Freisetzung. Die vermutete Ursache liegt in den unterschiedlichen Kollagenchargen, mit welchen die Kollagenscaffolds hergestellt wurden. Dies hatte zur Folge, dass die Gesamtmenge des freigesetzten VEGF nach 28 Tagen teilweise nur bei 20-40% der initial eingesetzten Dosis von 400 ng VEGF lag. Vermutlich bindet VEGF unterschiedlich stark an die beiden Hauptkomponenten der Scaffolds – Kollagen und Hydroxylapatit. Durch die (zwangsläufige) Verwendung verschiedener Kollagen-Chargen bei der Scaffold-Herstellung kann es zu Änderungen im Kollagen-zu-Mineral-Verhältnis gekommen sein, die sich leider im REM nicht nachweisen ließen auch nur z. T. durch die Glühverlustanalysen erkannt werden konnten. Diese Veränderungen der chemischen Zusammensetzung des Scaffoldmaterials kann der Grund für die beobachteten Streuungen der Ergebnisse bei Wiederholung der Experimente gewesen sein. Die zuvor dargestellten Daten wurden mit Scaffolds aus einer Kollagencharge erhalten und können als exemplarisch angesehen werden.

4.2.4 Bestimmung der biologischen Aktivität des aus den injizierten Depots freigesetzten VEGF

Nach einer Inkubation von Scaffold mit injiziertem Wirkstoffdepot wurde exemplarisch nach 7, 14 und 28 Tagen die mitogene Aktivität von VEGF im Freisetzungsmedium untersucht. Dazu wurde das entnommene Freisetzungsmedium in einem Experiment dem Zellkulturmedium zugegeben, um die proliferationsfördernde Wirkung von VEGF auf Endothelzellen zu untersuchen (siehe 3.8.2).

Zunächst wurde der Einfluss der Komponenten, welche zum Teil aus dem Depot freigesetzt wurden, auf indirekte Weise untersucht, in dem das Freisetzungsmedium von Scaffolds mit Depotkomponenten aber ohne Wachstumsfaktor nach 7, 14 und 28 Tagen auf Zellen gegeben und diese anschließend inkubiert wurden. Hierbei wurde kein Unterschied in der Zunahme der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle festgestellt.

In Abbildung 41 ist die Differenz der gemessenen Zellzahl der Kontrolle, welche auf 100% gesetzt wurde, mit den verschiedenen Varianten dargestellt. Das entnommene Freisetzungsmedium führte bei allen Depotvarianten im Vergleich zur Kontrollvariante zu einer relativ gleichen Zellzahl zu den gemessenen Zeitpunkten. Ein signifikanter Unterschied konnte einzig bei der Variante Hep im Vergleich zur Variante HYA festgestellt werden, bei der das entnommene Freisetzungsmedium der Variante Hep zu einer deutlich höheren Zellzahl führte. Ein negativer Einfluss auf die Zellproliferation von freigesetzten Komponenten (wie Alginat, Hyaluronsäure oder Methylcellulose) aus den Depots konnte somit ausgeschlossen werden.

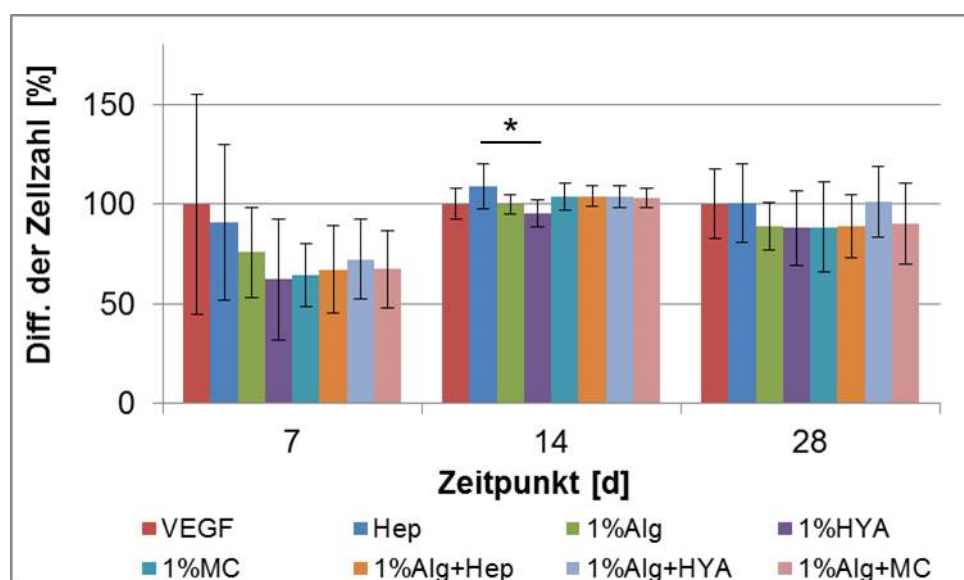


Abbildung 41: Einfluss von (potentiell) freigesetzten Depotkomponenten auf die Proliferation von Endothelzellen, untersucht anhand der Differenz der Zellzahl von verschiedenen Depotvarianten im Vergleich zur Kontrollvariante (auf 100% gesetzt) (n=3, Mittelwert \pm Stabw, *p < 0,05). Entnommenes Medium der Scaffoldvarianten wurde nach 7, 14 und 28 Tagen dem Zellmedium hinzugefügt und die Zellen für 72 h inkubiert.

Die Zunahme der Zellproliferation durch Zugabe von VEGF-haltigem Medium, welches von den einzelnen Varianten zu den Zeitpunkten 7, 14 und 28 Tagen entnommen wurde, ist in Abbildung 42 dargestellt. Hierbei wurde die Zunahme der Zellzahl von den jeweiligen Negativ-Kontrollen (entnommenes Medium von Scaffolds mit injizierten Depots, aber ohne VEGF) auf den Wert 1 gesetzt. Werte über 1 stehen somit für eine Zunahme der Zellproliferation aufgrund der biologischen Aktivität des freigesetzten VEGF.

Für alle Varianten und Zeitpunkte konnte die proliferationsfördernde Wirkung des freigesetzten VEGF nachgewiesen werden, aber es gab große Unterschiede zwischen den Zeitpunkten und den Varianten. Das nach 7, 14 und 28 Tagen freigesetzte VEGF im Medium aus der **Kontrollvariante** (mit injiziertem VEGF aber ohne Depot) war biologisch aktiv, auch wenn die Zunahme der Zellzahl am Tag 28 nur gering, im Vergleich zur Kontrolle ohne VEGF im Medium, war.

Auch für die Varianten der *Gruppe 1* (Hep, HYA, MC) konnte die mitogene Aktivität von VEGF nachgewiesen werden. Während das freigesetzte VEGF aus den Varianten **HYA** und **MC** zu einer 8-fachen Steigerung der Zellzahl am Tag 7 führte, sank die biologische Aktivität des freigesetzten VEGF am Tag 14 (5-fache Steigerung) und Tag 28 (2-fache Steigerung) kontinuierlich ab. Das freigesetzte VEGF aus der Variante **Hep** war hingegen in seiner mitogenen Aktivität zu den gemessenen Zeitpunkten relativ konstant und führte zu einer 4 bis 5,5-fachen Steigerung der Zellzahl. Auch zum späten Zeitpunkt nach 28 Tagen war das freigesetzte VEGF noch stark biologisch aktiv und führte zu einer signifikanten Steigerung der Zellzahl im Vergleich zu den Varianten HYA und MC. Freigesetztes VEGF aus den Varianten der Gruppe 1 hatte tendenziell (meist signifikant) eine höhere proliferationsfördernde Wirkung als die Kontrollvariante und führte zu einer gesteigerten Zellzahl.

In der *Gruppe 2* (Alg, Alg + Hep, Alg + HYA, Alg + MC) war die mitogene Aktivität des freigesetzten VEGF aus den Varianten zu den 3 Zeitpunkten ebenfalls höher im Vergleich zur Kontrollvariante. Bei den Varianten **Alg**, **Alg + Hep**, **Alg + HYA** und **Alg + MC** war die biologische Aktivität des freigesetzten VEGF im Medium nach 7 Tagen am höchsten und führte bis zu einer 8-fachen Zunahme der Zellzahl. Hierbei war die proliferationsfördernde Wirkung des entnommenen VEGF-haltigen Mediums aus den Varianten Alg + Hep und Alg + HYA, im Vergleich zu den Varianten Alg und Alg + MC, am größten. Danach sank diese nach 14 und nach 28 Tagen bei den Varianten Alg, Alg + HYA und Alg + MC kontinuierlich ab. Nur bei der Variante Alg + Hep zeigte sich, dass die biologische Aktivität des freigesetzten VEGF relativ konstant war und sogar am Tag 28 zu einer 7-fachen Zunahme der Zellzahl führte.

Die Variante Hep aus Gruppe 1 und die Variante Alg + Hep aus Gruppe 2 waren sich relativ ähnlich, so dass das freigesetzte VEGF auch am späteren Zeitpunkt nach 28 Tagen eine hohe proliferationsfördernde Wirkung hatte und zu einer signifikanten Steigerung der Zellzahl, im Vergleich zu der Kontrollvariante und den anderen Varianten ohne Heparin, führte. In Tabelle 27 wurde die Wirksamkeit der biologischen Aktivität, welche sich an der Zunahme der Zellzahl

orientiert, des freigesetzten VEGF aus den unterschiedl. Depots in einer Übersicht dargestellt.

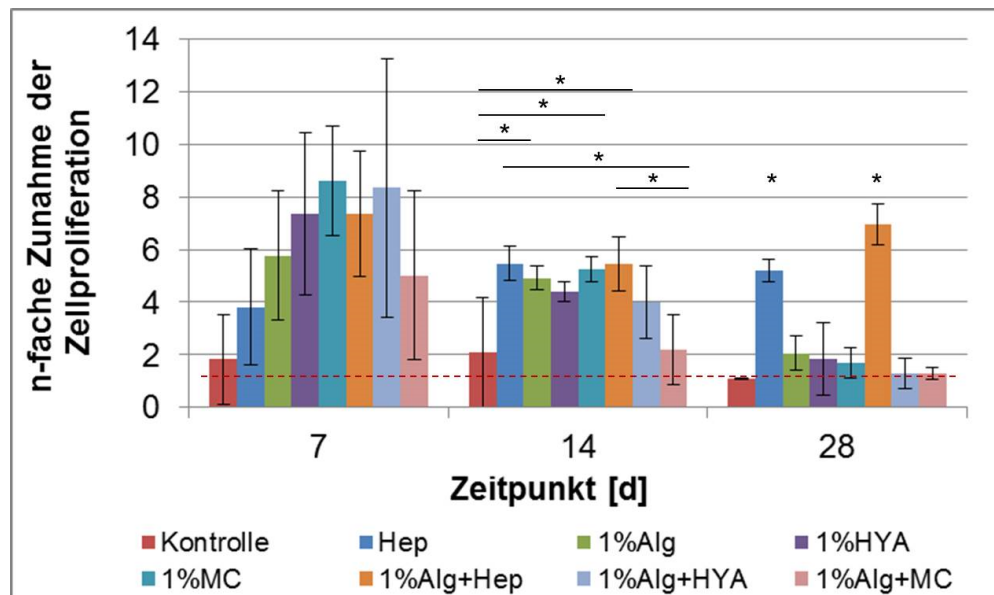


Abbildung 42: Biologische Aktivität des freigesetzten VEGF aus Scaffolds mit einem injizierten Depot zu den Zeitpunkten 7, 14 und 28 Tagen. Angegeben wird die n-fache Zunahme der Zellzahl im Vergleich zu Negativ-Kontrollen (VEGF-frei) (n=3, Mittelwert \pm Stabw, *p < 0,05). Die Zunahme der Zellzahl, gemessen anhand der DNA der Zellen nach der Inkubationszeit, wurde von den Negativ-Kontrollen (Medium der Scaffolds ohne VEGF) auf den Wert 1 gesetzt und mit der Zunahme der Zellzahl, welche mit freigesetztem Medium von den Scaffolds mit VEGF inkubiert wurden, ins Verhältnis gesetzt. Ein Wert über 1 zeigt somit die Zunahme der Zellzahl aufgrund der biologischen Aktivität des freigesetzten VEGF an.

Tabelle 27: Übersicht der biolog. Aktivität des zu den Zeitpunkten Tag 7, 14 und 28 aus injizierten Depots in Scaffolds freigesetzten VEGF. Einordnung der biolog. Aktivität anhand der Steigerung der Zellzahl.

	Tag 7	Tag 14	Tag 28
Kontrollvariante	+	+	+/-
Gruppe 1			
Hep	++	+++	+++
HYA	+++	++	+
MC	+++	+++	+
Gruppe 2			
Alg	+++	++	+
Alg + Hep	+++	+++	+++
Alg + HYA	+++	++	+/-
Alg + MC	+++	+	+/-
Legende:	+++	++	+
Biologische Aktivität	Sehr hoch	Hoch	Gering
Steigerung der Zellzahl	<5-fach	3 bis 5-fach	1,5 bis 3-fach

4.2.5 Migration von Endothelzellen durch Chemotaxis in Scaffolds mit injiziertem Wirkstoffdepot

Der Einfluss des freigesetzten VEGF aus injizierten Depots innerhalb der Scaffolds wurde auf eine gerichtete Migration von Endothelzellen in Richtung des Wirkstoffdepots hin untersucht. Dazu wurde die Scaffoldoberfläche mit Endothelzellen besiedelt, wobei ein vorzeitiges Eindringen der Zellen durch die Anwendung eines geringen Zellsuspensionsvolumens und mit Medium aufgefüllter Scaffolds verhindert wurde. Im Sinne des *in situ*-Tissue Engineering sollte getestet werden, ob durch die Ausbildung eines VEGF-Gradienten im Scaffold Zellen aufgrund einer Chemotaxis in Richtung des Depots im Inneren des Scaffolds migrieren (siehe Abbildung 13). Diese Zell-Migration wurde anhand von dünnen Scaffoldlängsschnitten mit Hilfe einer Färbung der Zellkerne quantifiziert.

Zunächst wurden in Vorversuchen mit Zellkulturgefäßen grundlegende Parameter (wie Zellmedium, Inkubationsdauer, Menge an VEGF und Zellpassage) für eine gerichtete Zellmigration ermittelt und diese auf das System aus Scaffold und injiziertem Wirkstoffdepot übertragen.

Bedingungen für eine Migration von HDMEC im Scaffold			
Medium	EC-Basalmedium ohne FCS	EC-Basalmedium mit 15 % FCS	EC-Wachstumsmedium
Mediumswechsel	täglich	kein Wechsel	
Kultivierungszeit	3 Tage	7 Tage	
Menge an VEGF	100 ng pro Scaffold	200-400 ng pro Scaffold	800 ng pro Scaffold
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>			
	ja	eingeschränkt	nein

Abbildung 43: Testung einer gerichteten Migration von Endothelzellen im Scaffold aus mineralisiertem Kollagen unter Verwendung des Wachstumsfaktors VEGF

Für die Migrationsversuche mit den Scaffolds mit injiziertem Wirkstoffdepot wurden letztlich folgende Parameter – Inkubationsdauer von 3 Tagen, Basalmedium, Zellpassage 5-8 und eine

VEGF-Menge von 100-400 ng/Scaffold – ausgewählt. Allerdings gab es weitere unbekannte Einflussgrößen wie die Scaffoldmorphologie, welche sich von Scaffold zu Scaffold geringfügig unterscheiden kann und die VEGF-Freisetzung aus dem Depot innerhalb des Scaffolds, die quantitativ nicht bestimmt werden konnte.

Migration von Endothelzellen in Richtung eines injizierten Wirkstoffdepots

Für die gerichtete Zell-Migration in Richtung eines Wirkstoffgradienten wurden Scaffolds mit einer injizierten Lösung aus 100, 200 und 400 ng VEGF in PBS/BSA, die gleichen VEGF-Mengen in einer Heparinlösung (1 mg/ml) und in einem 1% Alginat-Hydrogeldepot verwendet. Zum Vergleich wurden Scaffolds mit 200 ng VEGF homogen beladen. Nach dem Migrationsexperiment wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie eine optische Beurteilung der Verteilung der Zellen im Scaffold durchgeführt, bei dem das Scaffold mit einer Rasierklinge längsseitig halbiert wurde und die Innenseiten der Scaffoldhälften analysiert wurden.

Eine Migration von HDMEC in das Scaffold wurde bei den Varianten mit **200 ng** und **400 ng VEGF**, sowie mit **100 ng VEGF in 1% Alginat** festgestellt und Kryoschnitte zur detaillierten Analyse angefertigt. Die Zellverteilung bis zu einer Tiefe von 1000 µm in Scaffolds mit den aufgezählten injizierten Depots ist in Abbildung 44 dargestellt. Die Anzahl der insgesamt gezählten Zellen im Bereich von 0-1000 µm Tiefe wurde auf 100% gesetzt.

Bei der **Negativ-Kontrolle** wurde eine PBS/BSA-Lösung ohne VEGF injiziert, um die Blindmigration zu beurteilen. Hierbei gab es eine spontane Migration der Zellen bis zu einer Scaffoldtiefe von max. 500 µm, wobei sich die meisten Zellen im Bereich von 0-100 µm (ca. 28%) und 100-200 µm (ca. 35%) befanden. Danach sank die Zahl der migrierten Zellen mit fortschreitender Tiefe stark ab. Im Gegensatz zur Negativ-Kontrolle migrierten die Zellen bei den **Varianten mit injiziertem VEGF bzw. VEGF-haltigem Depot** tiefer in das Scaffold hinein und die Mehrzahl der Zellen befand sich im Bereich von 0-400 µm.

Auch die Konzentration des eingesetzten VEGF hatte einen Einfluss auf die Migration der Zellen. Bei **100 ng VEGF in einem 1% Alginatdepot** und **200 ng VEGF in einer PBS/BSA-Lösung** im Scaffold migrierten die Zellen deutlich bis zu einer Tiefe von 800 µm. 12% der insgesamt gezählten Zellen befanden sich bei den beiden Varianten im Bereich 0-100 µm, 100 µm tiefer waren es bereits 20% und im Bereich von 200-300 µm 22%. Im Gegensatz dazu zeigte die Variante mit **400 ng VEGF** ein verändertes Migrationsprofil, wobei ein erneuter leichter Anstieg der gezählten Zellzahl im Bereich von 500-800 µm zu sehen war und die Zellen bis in eine Tiefe von 1000 µm migrierten.

Es wurden weitere Varianten mit injizierter VEGF-haltiger Lösung (*100 ng VEGF in PBS/BSA* sowie *100, 200 und 400 ng VEGF in einer Heparinlösung (1 mg/ml)*), einem VEGF-haltigen Depot (*1% Alginat mit 200 und 400 ng VEGF*) und einem mit *200 ng VEGF homogen beladenen*

Scaffold in Hinblick auf eine gerichtete Zellmigration getestet. Bei diesen Varianten kam es zu keiner Einwanderung von Zellen und es wurde auf die Anfertigung von Kryoschnitten und eine nachträgl. Zählung der Zellen in der Scaffoldtiefe verzichtet. Eine Zusammenfassung der verwendeten Varianten mit gerichteter bzw. ohne erfolgter Migration ist in Tabelle 28 dargestellt.

Tabelle 28: Übersicht zum migrationsfördernden Effekt von VEGF, injiziert als Lösung oder mit Hydrogeldepot in Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen, auf Endothelzellen

	Effekt auf die Migration von HDMEC		
	100 ng VEGF	200 ng VEGF	400 ng VEGF
Injizierte Lösung aus PBS/BSA	-	+	++
Injizierte Heparinlösung (1 mg/ml)	-	-	-
Injiziertes 1% Alginatdepot	+	-	-
Homogene Beladung	/	-	/

Legende: / = nicht getestet, - = keine Migration, + = Migration in die Tiefe, ++ = weiteste Migration der Zellen im Vergleich zur Negativ-Kontrolle

Eine vergleichbare Migration der Zellen zeigte sich bei der Verwendung von einem injizierten **Hydrogeldepot** mit 100 ng VEGF und einer injizierten **Lösung** (ohne Depot) mit 200 ng VEGF. Es scheint, als ob die Variante mit 100 ng VEGF in 1% Alginat bezüglich der Migration effektiver war, als die doppelte Menge an VEGF ohne Hydrogeldepot.

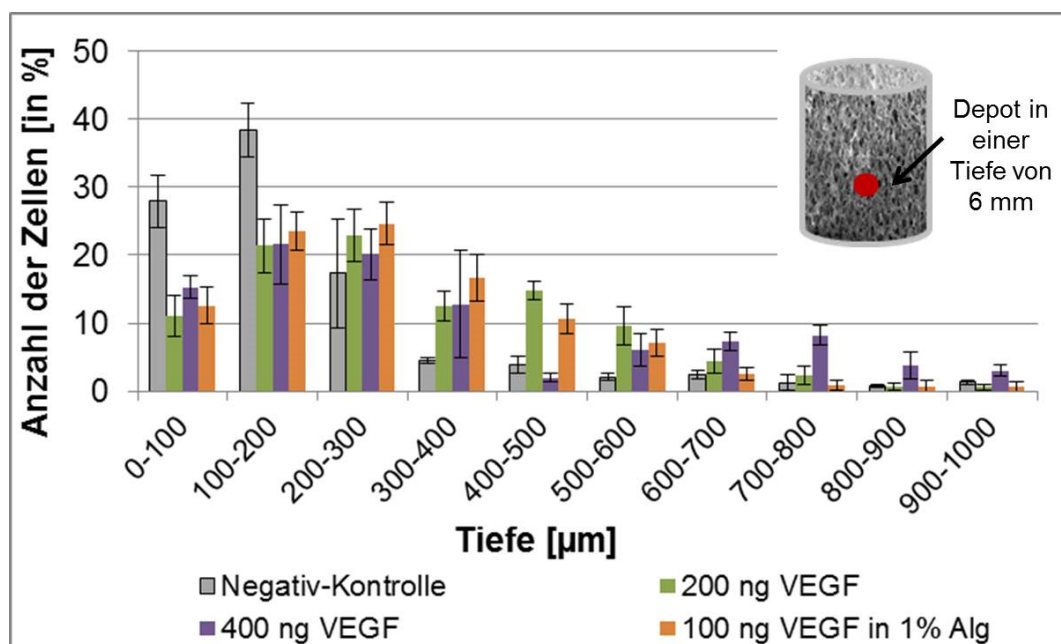


Abbildung 44: Zellverteilung von HDMEC in Scaffolds mit injiziertem Depot nach dreitägiger Kultivierung im Bereich von 0 bis 1000 µm Tiefe (0 µm = Besiedlungsoberfläche). Zur Analyse der Migration wurden

die Zellkerne aus 40 μm -Längsschnitten eines Scaffolds nach Fluoreszenzmarkierung gezählt. Als Kontrolle dienten Scaffold mit injizierter PBS/BSA-Lösung ohne VEGF. Die Anzahl der insgesamt gezählten Zellen wurde 100% gesetzt ($n=6$ (Anzahl der Schnitte pro Scaffold), Mittelwert \pm Stabw).

Die Ergebnisse des Migrationsversuches zeigen, dass mit Hilfe von VEGF, gelöst in einer PBS/BSA-Lösung oder in einem Hydrogel und injiziert in einen Scaffold, eine gerichtete Migration von Endothelzellen in Scaffolds bis zu einer Tiefe von 1000 μm nachgewiesen werden konnte. Zur Veranschaulichung der Zellmigration ist in Abbildung 45 die Zellverteilung im Scaffold ohne und mit 400 ng injiziertem VEGF zu sehen. Dabei sind die Zellen der Variante mit 400 ng injiziertem VEGF deutlich im gezeigten Ausschnitt des Scaffolds verteilt, während sich die Zellen bei der Variante ohne VEGF ausschließlich im oberen Drittel befinden.

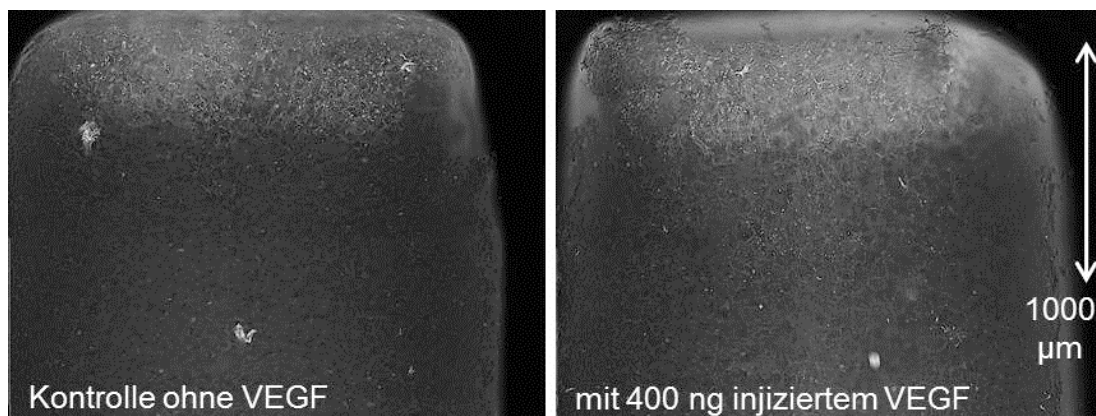


Abbildung 45: Zellverteilung im Scaffold mit und ohne VEGF anhand Fluoreszenz-mikroskopischer Aufnahmen. Anfärbung der Zellkerne mit Höchst, danach erfolgte eine Bildkonvertierung in schwarz-weiß. Zellkerne sind als helle Punkte zu erkennen.

Die Experimente zur gerichteten Migration wurden mehrfach durchgeführt. Die hier dargestellten Ergebnisse konnten dabei nicht immer reproduziert werden. Die Ursachen für eine ausbleibende Migration konnten im Rahmen der Arbeit nicht vollständig geklärt werden. Durch die gesammelten Erfahrungen wird vermutet, dass die Faktoren VEGF-Freisetzung und Scaffoldmorphologie von Bedeutung sind.

Es konnte aber sicher nachgewiesen werden, dass die gewählten Parameter (dreitägige Inkubation von HDMEC in Basalmedium, VEGF-Konzentrationen im Bereich von 100-400 ng/ml) eine Migration der Zellen begünstigt.

5 Diskussion

Gesundes Knochengewebe hat das Potential kleinere Defekte, wie Mikrorisse, selbst zu heilen. Bei größeren Defekten oder Vorliegen einer Krankheit, wie Osteoporose, reicht die Kapazität zur Regeneration nicht aus, woraufhin autologer Knochen oder Knochenersatzmaterialien zur Heilung eingesetzt werden sollten. Beim Tissue Engineering werden diese Materialien mit Zellen und verschiedenen Faktoren vorkultiviert, um so ein künstliches Gewebe herzustellen, welches anschließend in den Defektbereich implantiert wird. Allerdings gibt es bei größeren Implantaten einen gravierenden Nachteil: die initial fehlende Vaskularisierung. Aufgrund der Diffusionsgrenze ist eine Versorgung der Zellen bis zu einer Tiefe des Scaffolds von 200 µm limitiert, weshalb ein Großteil der Zellen in tieferen Ebenen abstirbt.

Ein alternativer Ansatz, welcher schwerpunktmäßig in dieser Arbeit behandelt wurde, ist das *in situ*-Tissue Engineering, bei dem auf eine Vorbesiedlung der Scaffolds verzichtet wird. Hierbei werden die Scaffolds funktionalisiert, um Wachstumsfaktoren gezielt freizusetzen. Solche Drug Delivery-Systeme sind auf die unterschiedlichen Gewebetypen (wie Haut, Knorpel oder Knochen) angepasst, so dass z.B. die Freisetzung des Wachstumsfaktors VEGF die Vaskularisierung als auch die Knochenneubildung fördert. Ein wesentlicher Punkt beim *in situ*-Tissue Engineering ist der Prozeß der Chemoattraktion. Die Scaffolds werden mit Chemokinen, wie SDF-1 α oder VEGF, funktionalisiert, um Zellen aus dem umliegenden Gewebe anzulocken und somit die Regeneration in gesundes Knochengewebe zu beschleunigen.

Ziel dieser Arbeit war es, ein für die Regeneration von Knochendefekten entwickeltes Scaffoldmaterial (Gelinsky et al., 2008) effizient mit dem angiogenen Modellwachstumsfaktor VEGF-A₁₆₅ zu beladen, um so das Problem der Vaskularisierung zu lösen. Somit sollte das eingesetzte VEGF durch eine kontrollierte und langanhaltende Freisetzung die Einprossung von Blutgefäßen in das Scaffold unterstützen und gleichzeitig die Proliferation, Differenzierung und Migration von Endothelzellen, aber auch MSC, fördern.

Als Scaffoldmaterial wurde in dieser Arbeit mineralisiertes Kollagen verwendet. Es wurden zwei unterschiedliche Strategien zur Modifizierung der Scaffolds mit VEGF untersucht. Zum einen wurden die Scaffolds homogen mit Heparin modifiziert, um den Faktor VEGF spezifisch zu binden und die Freisetzung zu verzögern, so dass die Vaskularisierung des Scaffoldmaterials gefördert wird. Zusätzlich kann Heparin Aminosäuren (u.a. Arginin oder Glycin (Caldwell et al., 1996)) oder Proteine (wie Fibronectin und Vitronectin (Hannan und Reilly, 1988)) aus dem Serum des Zellkulturmediums binden, welche damit am Scaffold angereichert werden und den Zellen direkt zur Verfügung stehen.

Zum anderen wurden die Scaffolds mit einem injizierbaren Wirkstoffdepot im Zentrum funktionalisiert. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Ausbildung eines Wirkstoffgradienten im Scaffold Endothelzellen (im Sinne des *in situ*-Tissue Engineering) durch Chemotaxis gerichtet in das

Scaffoldinnere migrierten. Zudem wurde die VEGF-Freisetzung aus den verschiedenen Depotkomponenten unterschiedlich stark verzögert und VEGF langanhaltend freigesetzt.

In den folgenden Abschnitten werden die erhaltenen Ergebnisse diskutiert.

5.1 Heparin-Modifizierung

Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen wurden auf zwei unterschiedlichen Ansätzen mit Heparin modifiziert: 1. Heparin wurde während des Herstellungsprozesses der Kollagensuspension dazugegeben („in situ“), wobei die Kollagenfibrillierung und Mineralisation in Gegenwart von Heparin ablief und 2. nach der Herstellung der Scaffolds wurden diese mit Heparin modifiziert („post“). Daraufhin wurde der Einfluss von Heparin auf die Scaffoldseigenschaften untersucht.

5.1.1 Integration von Heparin in Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen

Interaktion von Kollagen und HAP mit Heparin

Heparin ist ein stark negativ geladenes, lineares Polymer aus sich wiederholenden Zuckereinheiten aus D-Glucosaminen und Uronsäure (D-Glucuronsäure und L-Iduronsäure) (Fromm et al., 1997; Kamei et al., 2001; Capila und Linhardt, 2002). Durch elektrostatische Interaktionen vermittelt Heparin die Bindung an basische Aminosäuren (Jackson et al., 1991; Fromm et al., 1997; Iozzo, 1997; Kamei et al., 2001; Capila und Linhardt, 2002), welche auch im Kollagen vorkommen. Unter anderem wurde in den Arbeiten von (Mathews, 1965; Öbrink, 1973) festgestellt, dass aufgrund von starken elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen positiv geladenen und polaren Gruppen des Kollagens und dem anionischen Heparin stabile Komplexe gebildet werden. Auch (Sweeney et al., 1998) und (San Antonio et al., 1994) konnten eine hohe Bindungsaffinität von Heparin an Kollagen Typ I nachweisen. Die Spezifität der Interaktionen mit vielen Proteinen wird in der Struktur und Orientierung der Sulfat- und Carboxyl-Gruppen und der hohen negativen Ladung von Heparin vermutet (Capila und Linhardt, 2002). In den Arbeiten von (Stamov et al., 2008; Stamov et al., 2011) wurde Heparin zu Kollagenmonomeren hinzugegeben und die Kollagenfibrillierung fand in Gegenwart von Heparin statt. Dieser Ansatz entspricht der in dieser Arbeit angewendeten Strategie der „insitu“-Modifizierung der Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen. Heparinmoleküle schienen während der Fibrillenbildung mit den Kollagenfibrillen zu interagieren und zu einer veränderten Morphologie in Form von eher gerade angeordneten und dickeren Kollagenfibrillen, im Gegensatz zu eher gedrehten und dünneren Fibrillen in Abwesenheit von Heparin, zu führen (Stamov et al., 2008; Stamov et al., 2011). Es wird vermutet, dass Heparin die Kollagenmikrofibrillen stabilisiert und die parallele Anlagerung der Fibrillen, durch die Einlagerung von Heparin in die Kollagenfibrillen, unterstützt. Auch Studien von (McPherson et al., 1988) beschreiben den Einbau von Heparin während der Kollagen-

fibrillogenese (vergleichbar mit dem „insitu“-Ansatz), welcher zu einer gesteigerten Stabilität und dickeren Fibrillen (im Gegensatz zu Kollagen ohne Heparin) führte. Hierbei wird vermutet, dass sich die negativ geladenen Heparinmoleküle an positiven Gruppen auf der Fibrilloberfläche anlagern. Damit dienen die Heparinmoleküle als „Verbindung“ von benachbarten Fibrillen, welche sich anhand von elektrostatischen Interaktionen an die Heparin-beladene Fibrille anlagern (McPherson et al., 1988; Stamov et al., 2008). Diese starken elektrostatischen Interaktionen von Heparin mit Tropocollagen (Stamov et al., 2008) scheinen bei der Bindung von Heparin an „insitu“-modifizierte Scaffolds von Bedeutung zu sein. Zusätzlich wird das am Kollagen gebundene Heparin durch den Mineralisationsprozess in den Komposit „eingebaut“. Allerdings handelt es sich in den Studien um ein 2-Komponenten-System aus Kollagen und Heparin was den Vergleich mit dem hier verwendeten 3-Komponenten-System aus Kollagen, Mineral und Heparin erschwert.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bezüglich der Bindung von Heparin ist der Mineralanteil (HAP) des Scaffolds. In einigen Studien (Embery et al., 1979; Rees et al., 2002; Lode et al., 2008) konnte bereits die starke Bindung von Heparin an HAP nachgewiesen werden. Auch (Capila und Linhardt, 2002) beschreibt eine Calcium-abhängige Bindung, wobei Heparin indirekt, durch Wasserstoffbrücken an Wassermolekülen nahe dem Calcium, bindet. Diese spezifische Bindung von Heparin am Hydroxylapatit ist bei dem Ansatz der „post“-Modifizierung von Bedeutung, bei welcher Heparin nachträglich an den bereits vernetzten Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen binden kann. Durch REM-Aufnahmen der Scaffoldoberfläche wurde ersichtlich, dass Kollagen überwiegend von HAP bedeckt war. Dies verstärkt die Annahme der Bindung größerer Mengen von Heparin an HAP im Vergleich zur Bindung an Kollagen.

Bindung von Heparin an Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen

Es wurde gezeigt, dass die Menge an gebundenem Heparin an den Scaffolds bei der „post“-Modifizierung auf 200 mg Heparin/g Kollagen beschränkt war. Vermutlich war der Großteil der Bindungsstellen am Kompositmaterial gesättigt, so dass weitere Heparinmoleküle nicht mehr binden konnten. Dies bestätigte auch die Wiederfindungsmessung der restlichen Heparin-Menge im Überstand. In Studien von (Wissink et al., 2001) an Kollagenmatrices mit Heparin war die Sättigung, im Vergleich zu den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten, stark verringert (mit 55 mg Heparin/g Kollagen, nachträgliche Modifizierung), wohingegen sie in den Arbeiten von (Wolf-Brandstetter et al., 2006) (nachträgliche adsorptive Heparinbindung an Kollagenmatrices) um fast ein Dreifaches (mit 560 mg Heparin/g Kollagen) erhöht war. Vermutlich liegt die Ursache der unterschiedlich gebundenen Heparinmenge an der Verwendung verschiedener Kollagenquellen (nicht lösliches Kollagen von Rindersehnen (Wissink et al., 2001), lösliches Kollagen aus Rinderhaut (Wolf-Brandstetter et al., 2006) und Kollagen vom Rind ohne Telopeptide (in dieser Arbeit verwendet)) und der Vernetzungsprozedur (Aktivierung von Carboxylgru-

pen des Heparins durch EDC (Wissink et al., 2001) und ohne Aktivierung (Wolf-Brandstetter et al., 2006), sowie in dieser Arbeit). Eine weitere Ursache könnte auch die Scaffoldmorphologie (2D (Wissink et al., 2001), (Wolf-Brandstetter et al., 2006) und 3D in dieser Arbeit) sein. Des Weiteren enthielten die Scaffolds in dieser Arbeit neben Kollagen und Heparin eine zusätzliche mineralische Komponente aus HAP.

Bei der „insitu“- und „post“-Modifizierung der Scaffolds mit 30, 75 und 150 mg Heparin/g min. Koll. konnte die Bindung von Heparin an Kollagen/HAP bestätigt werden. Allerdings wurde bei der „insitu“-Modifizierung nicht die vollständig eingesetzte Heparinmenge am Scaffoldmaterial gebunden (30-50% Verlust). Im Gegensatz zu der „post“-Modifizierung wurde das Heparin bei der „insitu“-Modifizierung am Material mit EDC vernetzt. Eine EDC-Vernetzung von Heparin an Kollagen wurde in Studien von (Linhardt et al., 2008) untersucht, wobei die Bindungsstabilität des chemisch vernetzten Heparins höher war als die nach einer physischen Adsorption. Es ist zu vermuten, dass bei der „insitu“-Modifizierung Heparin bezüglich der Bindung an Kollagen mit der Mineralphase konkurriert und dadurch nicht vollständig im Kompositmaterial eingebaut wird. Wahrscheinlich war durch das große Volumen des Überstandes (2 l) die nicht gebundene Heparinmenge unterhalb der Nachweisgrenze des DMMB-Assays und konnte somit nicht detektiert werden.

Im Gegensatz zu der „insitu“-Modifizierung wurde bei der „post“-Modifizierung das eingesetzte Heparin nahezu vollständig – gebunden an den Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen – wiedergefunden, was für eine hohe Bindungsaffinität von Heparin an Kollagen und HAP spricht. Bei dieser Modifizierungsvariante wurden gefriergetrocknete Scaffolds in einem relativ kleinen Volumen (ca. 10 ml) einer Heparin-haltigen Lösung inkubiert, wodurch die Detektion des verbliebenen Heparins mittels DMMB-Assay kein Problem darstellte. In einer vergleichbaren Studie der Gruppe (König et al., 2014) mit Heparin-modifizierten mineralisierten Kollagenmatrices (2D) zeigte sich ein ähnliches Ergebnis. Es wurde weniger Heparin in Scaffolds, bei denen während der Herstellung Heparin zugegeben wurde, als an nachträglich modifizierten Scaffolds wiedergefunden. Eine geringere Effizienz der Heparinimmobilisierung beim Einbau während der Fibrillenbildung (vergleichbar dem „insitu“-Ansatz) im Gegensatz zu einer nachträglichen Adsorption an vernetzte Kollagenfibrillen (vergleichbar der „post“-Modifizierung) wurde auch in der Arbeit von (Wolf-Brandstetter et al., 2006) nachgewiesen.

Die Bindungsstabilität von Heparin an den modifizierten Scaffolds („insitu“ und „post“) aus mineralisiertem Kollagen wurde zudem über einen Zeitraum von 28 Tagen unter Zellkulturbedingungen untersucht. Der Anteil des gebundenen Heparins nahm um durchschnittlich 20% ab. Hierbei haben die Art der Modifizierung (unterschiedliche Bindungsmechanismen und -stabilität und Vernetzung bei „insitu“ und „post“) und die Heparinkonzentration einen wichtigen Einfluss. Tendenziell schien sich beim Einsatz von größeren Heparinmengen sich auch prozentual mehr Heparin von den Scaffolds abzulösen. Es ist zu vermuten, dass ein gewisser Anteil am

gebundenen Heparin durch eventuelle Materialdegradation *in vitro* oder durch Verwirbelungen beim Mediumswechsel in der Zellkultur abspülen lässt. Ein anderes Ergebnis zeigte die Arbeit von (Wolf-Brandstetter et al., 2006), bei der die Menge an adsorptiv gebundenem Heparin an Kollagen während der ersten 2 h Auslagerung in PBS um 50% abnahm, wohingegen der Anteil an gebundenem vernetzten Heparin (entspricht „insitu“) über 7 d konstant blieb. Diese Studie mit dem hier verwendeten 3-Komponentensystem aus Kollagen, Mineral und Heparin ist aufgrund des Fehlens von HAP nur schwer vergleichbar. In den Arbeiten von (König et al., 2014) bestehen die Scaffolds aus den selben drei Bestandteilen, aber es wurde Telopeotid-haltiges Kollagen in 2D-Struktur verwendet, was eine Diskussion mit den eigenen Ergebnissen erschwert. Auch Studien von (Harley et al., 2009) beschreiben ein System aus 3 Komponenten mit Kollagen, Glykosaminoglykanen und Calciumphosphat, aber die Herstellung der Scaffolds durch Zusammenrühren einer Suspension und Präzipitation in Phosphorsäure ist im Vergleich zu den in dieser Arbeit hergestellten Scaffolds sehr verschieden und der Fokus der Studien lag nicht auf der Verwendung von Heparin/Glykosaminoglykanen.

Bei der qualitativen Bestimmung des Heparingehaltes an den Scaffolds zeigten vor allem die „insitu“-modifizierten Scaffolds eine intensivere Färbung auf der Oberfläche und im Querschnitt der Scaffolds aufgrund der Ausbildung von DMMB/Heparin-Komplexen. Ausgehend von der „insitu“-Modifizierungsvariante, bei der das Heparin vor der Fibrillierung und Mineralisierung zugegeben wurde, ist es nachvollziehbar, das Heparin gleichmäßig im gesamten Scaffold verteilt ist und damit bei der Färbung deutlich sichtbar war.

Bei der „post“-Modifizierung konnte sich das Heparin nur an der Oberfläche des Fibrillen/Mineral-Nanokompositmaterials anlagern. Dennoch war Heparin in den Färbungen (je nach eingesetzter Heparinkonzentration) auf der Oberfläche und im Querschnitt des Scaffolds zu erkennen, was auf die Porenstruktur zurückzuführen ist. Vermutlich sind Unterschiede in der Anlagerung des Heparins (z.B. am Material oder zwischen Kollagen und HAP) erst im Nanometerbereich sichtbar, was aber mit dem verwendeten optischen Stereomikroskop technisch nicht möglich war.

5.1.2 Einfluss von Heparin auf die Scaffold Eigenschaften

Mechanische Kenngrößen, der Elastizitätsmodul und die Druckspannung, wurden von den modifizierten Scaffolds („insitu“ und „post“) im Vergleich zur Heparin-freien Variante bestimmt, um einen eventuellen Einfluss von Heparin festzustellen. In einer früheren Studie wiesen die porösen Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen einen Elastizitätsmodul von 90 kPa (Gelinsky et al., 2008) auf, welcher vergleichbar mit den Scaffolds ohne Heparin-Modifizierung ist. Bei den „insitu“-modifizierten Varianten zeigte sich, dass die mechanischen Eigenschaften des Materials im Gegensatz zur Heparin-freien Variante und der „post“-Modifizierung gesteigert und die

Scaffolds steifer und fester wurden. Vermutlich wurde durch die Interaktionen des Heparins während der Kollagen-Fibrillenbildung von „insitu“-modifizierten Scaffolds die Kollagenstruktur stabilisiert, wie von (McPherson et al., 1988; Stamov et al., 2008) angedeutet, welches sich in den gesteigerten mechanischen Werten widerspiegelt. Der leicht erhöhte Mineralgehalt im Bereich von ca. 68% gegenüber Scaffolds ohne Heparin mit ca. 65% scheint hierbei vernachlässigbar zu sein.

Die „post“-modifizierte Variante weist im Vergleich zur „insitu“-Variante einen geringeren Elastizitätsmodul und verminderte Druckspannung auf. Ein weiterer Faktor ist ein weiterer Gefrier-trocknungsprozess, der bei der „insitu“- und der Heparin-freien Variante nicht notwendig war. Somit konnten möglicherweise durch die erneute Bildung von Eiskristallen beim Einfrierprozess bereits vorhandene Strukturen innerhalb des Scaffolds zerstört und damit die mechanischen Eigenschaften negativ beeinflusst worden sein.

Neben den mechanischen Eigenschaften des Scaffolds ist eine poröse Struktur für die Anwendung im *in situ* Tissue Engineering ein wichtiger Faktor. Die Porengröße der mineralisierten Kollagenscaffolds lag bei ca. 130 µm im Durchschnitt (Bestimmung anhand von REM-Aufnahmen), welches im optimalen Bereich für das Knochengewebe ist, um die Zellbesiedlung, das Einwandern von Zellen in die Poren und das Einwachsen von Blutkapillaren zu fördern (Patel et al., 2002; Cui et al., 2007; Gelinsky et al., 2008; Harley et al., 2009; Kanungo und Gibson, 2009; Meyer et al., 2009). Die „insitu“- und „post“-Modifizierung der Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen mit unterschiedlichen Heparinkonzentrationen hatte keinen Einfluss auf die Mikrostruktur (Porengeometrie). Im Gegensatz zu den Studien von (McPherson et al., 1988; Stamov et al., 2008; Stamov et al., 2011) schien der Einbau von Heparin während der Fibrillogenese einen Einfluss auf die Fibrillenstruktur zu haben. Vermutlich ist das Verhalten beim Heparineinbau durch die Komponente Mineral bzw. das Zusammenspiel der Komponenten Kollagen und Mineral deutlich anders. Auch Untersuchungen zur Nanostruktur mittels TEM ergaben keine großen Unterschiede in der Orientierung und Größe der Kristallplättchen zwischen Heparin-freien und „insitu“-modifizierten Scaffolds.

Zusätzlich wurde der Einfluss der Heparin-Modifizierung auf die Zusammensetzung der Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen untersucht. Im Vergleich zur Heparin-freien Variante führte die „insitu“-Modifizierung zu einem leicht erhöhten Mineralanteil, wohingegen die „post“-Modifizierung einen leicht reduzierten Mineralanteil aufwies. Im Gegensatz dazu wurde in den Arbeiten von (König et al., 2014) ein stark reduzierter Mineralanteil bei der Zugabe von Heparin während der Herstellung von mineralisierten Kollagenmatrices (im Vergleich zu einer Heparin-freien Variante und der nachträglich modifizierten Variante) gefunden. Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede ist das Telopeptid-haltige Kollagen im Gegensatz zum Telopeptid-freien

Kollagen, welches in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Die Studie von (Stamov et al., 2011) beschreibt aber Interaktionen von Heparin mit beiden Kollagen-Typen, wobei stärkere Wechselwirkungen von Heparin mit Telopeptid-freiem Kollagen durch eine hier vorhandene höchst basische Bindungsstelle auftreten. Dennoch kann der Prozess der Fibrillenbildung von Telopeptid-haltigem Kollagen, im Gegensatz zu Telopeptid-freiem Kollagen, in Gegenwart von Heparin durch die dritte Komponente (Calciumphosphat) stark beeinflusst werden und verursacht so die Unterschiede im Mineralgehalt der Scaffolds.

5.1.3 Einfluss auf die Adhäsion, Proliferation und Differenzierung von hMSC

In früheren Arbeiten zur Charakterisierung von Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen von (Bernhardt et al., 2007; Lode et al., 2008) konnte gezeigt werden, dass hMSC auf dem Material adhären, proliferieren und sich osteogen differenzieren. Der Einfluss der Heparin-Modifizierung der Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen auf die Adhäsion, Proliferation und osteogene Differenzierung wird im folgendem diskutiert. Dazu wurde die LDH-Aktivität (als Maß für die Zellzahl), ALP-Aktivität (osteogene Differenzierung), die Zellvitalität und -verteilung (mittels MTT-Test) und die Zellverteilung (anhand von REM-Aufnahmen) von mit hMSC besiedelten Scaffolds bestimmt. Die Modifizierung der Scaffolds mit Heparin („insitu“ und „post“) bewirkte hierbei eine verbesserte Adhäsion der Zellen *in vitro*, förderte die Proliferation und steigerte deutlich die osteogene Differenzierung gegenüber Heparin-freien Scaffolds.

Es konnte in den Versuchen zuerst die Einwanderung von Zellen in das Scaffoldmaterial durch die interkonnektierende Porenstruktur, später dann eine homogene Zellverteilung anhand von REM- und MTT-Aufnahmen bestätigt werden. Die Modifizierung mit Heparin („insitu“ und „post“) führte zu einem beschleunigten Einwachsen der Zellen in das Scaffold.

Wie zuvor beschrieben, bindet Heparin zahlreiche Proteine und Wachstumsfaktoren, welche die Adhäsion, Proliferation und Differenzierung von Zellen fördern. Unter anderem spielen die Faktoren Fibronectin und Vitronectin, welche im Serum des Zellkulturmediums enthalten sind, eine entscheidende Rolle bei der Zellanheftung an Oberflächen (Trowbridge und Gallo, 2002; Benoit et al., 2007; Vater, 2009; Gümüşderelioğlu und Aday, 2011). Heparin-modifizierte Scaffoldoberflächen sind im Vergleich zu Heparin-freien Varianten attraktiver für Zellen, da durch starke negative Ladungen des Heparins Serumproteine (u.a. Adhäsions- und Wachstumsfaktoren) gebunden und somit auch an der Oberfläche präsentiert werden. Aber auch Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen ohne Heparin sind sehr biokompatibel, in dem sie durch die vorhandenen RGD-Sequenzen des Kollagens die Zelladhäsion fördern und das Mineral HAP Serumproteine bindet (Kilpadi et al., 2001).

Ausgehend von dem beschriebenen Mechanismus der Heparin/Protein-Interaktionen zeigte sich bei der Kultivierung von hMSC auf Heparin-modifizierten gegenüber Heparin-freien Scaffolds ein positiver Einfluss des Heparins. Hierbei förderte Heparin die Adhäsion auf den Scaffolds und führte bei den „insitu“- und „post“-modifizierten Scaffolds im Vergleich zur Heparin-freien Variante fast zu einer Verdoppelung der Zellzahl. Übereinstimmend wurde in den Arbeiten von (Lode et al., 2008) eine Steigerung der Zellzahl (Endothelzellen) auf Heparin-modifizierten Calciumphosphatzementoberflächen nach 24 h Adhäsionszeit im Vergleich zu einer Zementoberfläche ohne Heparin beschrieben. Auch nach weiterer Kultivierung über 28 Tage förderte die Heparin-Modifizierung der Scaffolds die Zellproliferation, wobei die Zellzahl auf „insitu“- und „post“-modifizierte Varianten im Gegensatz zur Heparin-freien Variante signifikant erhöht war. Vermutlich werden die Proteine durch die Interaktion mit Heparin stabilisiert und deren biologische Aktivität verbessert, wie es in zahlreichen Studien beschrieben wird (Capila und Linhardt, 2002; Trowbridge und Gallo, 2002; Benoit und Anseth, 2005). Ein Unterschied bei der Zellproliferation zwischen „insitu“- und „post“-modifizierten Varianten und den verschiedenen, eingesetzten Heparinkonzentrationen war nicht zu erkennen. Allerdings wurde nachgewiesen, dass ein Teil des eingesetzten Heparins über die Kultivierungsdauer freigesetzt wurde. In verschiedenen Studien wurde einerseits gezeigt, dass lösliches Heparin im Medium die Proliferation förderte (Kumarasuriyar et al., 2009) und andererseits die Proliferation und Differenzierung von Zellen aufgrund der starken negativen Ladungen des Moleküls inhibierte (Nikitovic et al., 2005). Vielmehr scheint es einen konzentrationsabhängigen Effekt zu geben, bei dem geringe Konzentrationen ($<1 \mu\text{g/ml}$) von Heparin die Proliferation und Differenzierung stimulieren, während höhere Konzentrationen ($>5 \mu\text{g/ml}$) die metabolische Aktivität der Zellen inhibieren (Hausser und Brenner, 2004). Aufgrund der zu hohen Nachweisgrenze des DMMB-Assays konnte bei den Heparin-modifizierten Scaffolds während der Kultivierungsdauer nicht nachgewiesen werden, wieviel Heparin ins Zellmedium freigesetzt wurde. In Kombination mit unterschiedlichen Scaffolds zeigten viele Studien einen positiven Effekt von Heparin auf die Proliferation von verschiedenen Zelltypen. In den Arbeiten von (Ruozzi et al., 2009) förderten Heparin-modifizierte kollagenbasierte Membranen die Proliferation von Fibroblasten, während die Studie der Gruppe (Gümüşderelioğlu und Aday, 2011) eine Unterstützung der Proliferation und osteogenen Differenzierung von Präosteoblasten auf Heparin-funktionalisierten Chitosanscaffolds zeigte. (Benoit und Anseth, 2005) beschreibt eine erhöhte Zelladhäsion, Proliferation und osteogene Differenzierung von hMSC in Heparin-modifizierten PEG-Hydrogelen im Vergleich zu Hydrogelen ohne Heparin. Der positive Effekt von Heparin auf die metabolische Aktivität der Zellen wird in den Studien durch die Bindung von Serumproteinen diskutiert.

Zusätzlich wurde in den eigenen Versuchen die osteogene Differenzierung anhand des frühen osteoblastären Markers ALP untersucht. Dabei zeigte sich bei allen gemessenen Zeitpunkten, unter Zugabe von osteogenen Supplementen, eine signifikante Zunahme der ALP-Aktivität von

Zellen auf Heparin-modifizierten Scaffolds im Vergleich zu Zellen auf Heparin-freien Scaffolds. Ein Unterschied der ALP-Aktivität zwischen „insitu“- und „post“-modifizierten Scaffolds war nicht zu erkennen. Allerdings hatte die eingesetzte Heparinkonzentration bei den „insitu“-modifizierten Scaffolds einen Einfluss, wobei mit steigender Heparinkonzentration auch die ALP-Aktivität der Zellen auf dem Material zunahm. Bei den „post“-modifizierten Scaffolds war dieser Effekt tendenziell auch zu beobachten. Eine Erklärungsmöglichkeit ist einerseits eine indirekte Wirkung von Heparin durch die Bindung und Anlagerung von osteogenen Faktoren (wie BMP-4 (Tomoyasu et al., 2007)) durch das am Scaffold gebundene Heparin. Andererseits könnte Heparin auch eine direkte Wirkung haben, in dem durch Interaktionen von gebundenen Faktoren deren biologische Wirkung verstärkt wurde und dies somit zu einem gesteigerten Effekt auf die osteogene Differenzierung der Zellen führte. In der Literatur wird beschrieben, dass durch die Protein-bindenden Domänen von Heparin/Heparinsulfat *in vivo* die Differenzierung von hMSC in Osteoblasten mit reguliert wird. Neben bFGF sind auch Faktoren der TGF- β Familie, als auch Kollagene, Laminine und Fibronektine von Bedeutung (Cool und Nurcombe, 2005; Jackson et al., 2006). Eine Förderung der osteogenen Differenzierung durch Heparin wurde in unterschiedlichen Arbeiten beschrieben. In Studien von (Mathews et al., 2014) konnte durch die Beschichtung von Zellkulturplatten mit Heparin eine gesteigerte ALP-Aktivität von hMSC und die Hochregulation von osteogenen Markern nachgewiesen werden. Heparin-funktionalisiertes PEG-basiertes Material konnte in Lösung befindliches bFGF binden und die Heparin-funktionalisierten Scaffolds unterstützten die osteogene Differenzierung von hMSC (Benoit und Anseth, 2005; Benoit et al., 2007). Auch Studien von (Liu et al., 2010) und (Gümüşderelioğlu und Aday, 2011) mit Chitosan/Heparin-Scaffolds zeigten einen förderlichen Effekt von Heparin auf die osteogene Differenzierung von hMSC.

5.1.4 VEGF-Freisetzung und biologische Aktivität

Bindung von VEGF an das Scaffoldmaterial

Die Bindung des Wachstumsfaktors VEGF an Heparin-freie Scaffolds ist unspezifisch und erfolgt größtenteils an die Mineralphase. Die nicht kovalente Bindung von HAP mit verschiedenen Proteinen auf atomarer Ebene ist bis heute nicht eindeutig geklärt (Dong et al., 2007). In den Arbeiten von (Dong et al., 2007) wird vermutet, dass Wachstumsfaktoren im Wesentlichen mit HAP-Kristallen interagieren können. Anhand des Wachstumsfaktors BMP-2 wurden Interaktionen mit OH^- , NH_3^+ und COO^- nachgewiesen, wobei viele Proteine in den Experimenten nur mit der funktionellen Gruppe COO^- interagierten. Die Adsorptionsmechanismen beruhen dabei neben den Coulomb-Kräften auch auf Wasserstoffbrückenbindungen, die bei Gruppen ohne Nettoladungen (OH und NH_2) eine Rolle spielen. (Boix et al., 2005) konnte die Adsorption von BMP-2 an präzipitierten HAP-Kristallen nachweisen. Dabei wurden die basischen Aminosäurereste, welche in einer hohen Konzentration im Molekül BMP-2 vorliegen, bei einem pH-Wert

unterhalb des isoelektrischen Punktes von BMP-2 protoniert und formten Wasserstoffbrückenbindungen mit der HAP-Oberfläche. Schlussfolgernd kann diese Bindung auch für den Wachstumsfaktor VEGF an die HAP-Phase des Scaffolds gelten, da dieser auch einen hohen Anteil an basischen Aminosäuren besitzt (Grünwald et al., 2010; Chen et al., 2011). Unter diesem Gesichtspunkt konnte eine relativ starke Bindungseffizienz auch an den Heparin-freien Scaffolds nachgewiesen werden, bei denen 90% der eingesetzten VEGF-Menge gebunden hatte. Eine noch bessere Bindungseffizienz mit nahezu 99% konnte an Heparin-modifizierten Scaffolds festgestellt werden. Wie bereits beschrieben, bindet Heparin spezifisch den Wachstumsfaktor VEGF, so dass eine sehr effektive Bindung des eingesetzten Faktors am modifizierten Material zustande kommt. VEGF-A₁₆₅ ist eine Heparin-bindende Isoform (Klagsbrun und D'Amore, 1996; Ferrara, 1999; Breier, 2000). Hierbei scheint die Heparin-bindende Funktion von VEGF-A₁₆₅ komplett von einer Domäne am Carboxyterminalen Ende (Aminosäuren von 111-165) vermittelt zu werden (Berleau, 1996). Dadurch bindet der Wachstumsfaktor spezifisch und reversibel am Scaffold-gebundenen Heparin. In den nachfolgenden Abschnitten wird die VEGF-Freisetzung von Heparin-freien und Heparin-modifizierten Scaffolds diskutiert, wobei sich ein positiver Effekt der spezifischen Bindung von VEGF an Heparin bestätigte.

Initiale VEGF-Freisetzung

Bei der Freisetzung des VEGF aus Heparin-freien Scaffolds führte die unspezifische Bindung des Faktors an die Komponenten Kollagen und Mineral zu einer hohen initialen Freisetzung des eingesetzten VEGF von 35% am Tag 1.

Im Gegensatz zur Heparin-freien Variante gab es nur eine sehr geringe initiale Freisetzung bei den Heparin-modifizierten Varianten. Es wurden geringere Mengen von VEGF im Bereich von 2-8% am Tag 1 freigesetzt. Die Freisetzungsrates wurde bei den „insitu“-modifizierten Varianten durch die unterschiedlichen, eingesetzten Heparinkonzentrationen (30, 75 und 150 mg Heparin/g min. Koll.; mehr Heparin verzögerte die Freisetzung von VEGF stärker), vermutlich durch die Anzahl an Heparinbindungsstellen am Scaffold, beeinflusst.

Mit den bisherigen Daten ist derzeit ungeklärt, ob ein Freisetzungssystem mit einer hohen initialen und einer anschließenden langanhaltenden Freisetzung nicht sogar effektiver ist als ein Freisetzungssystem ohne „initial burst“. Neben dem anfänglichen Verlust des Wachstumsfaktors bei einer hohen initialen Freisetzung und damit auch einer fehlenden Wirksamkeit im Anwendungsbereich, werden in der Literatur negative Effekte beschrieben, wenn zu hohe Dosen an VEGF freigesetzt werden. Dabei kann es bei der Bildung von neuen Blutkapillaren zu missgebildeten Gefäßen kommen, die eine hohe Gefäßundichtigkeit aufweisen oder dichte Gefäßstrukturen ohne Funktion ausgebildet werden (Drake und Little, 1995; Horowitz et al., 1997; Zisch et al., 2003). Darüber hinaus ist VEGF konzentrationsabhängig an der Osteogenese

beteiligt und hohe Dosen können den Prozess inhibieren (Gerber et al., 1999; Dai und Rabie, 2007). VEGF induziert eine normale Angiogenese oder die Bildung von geschädigten Kapillaren in einem strikt konzentrationsabhängigen Muster (Ozawa et al., 2004). *In vitro* wurde in dieser Arbeit am Beispiel der proliferationsstimulierenden Wirkung von VEGF der Einfluss der Konzentration nachgewiesen, in dem die Proliferation der Zellen außerhalb des Bereich von 10-17 ng VEGF/ml abnahm (siehe „Biologische Aktivität des freigesetzten VEGF“ in diesem Abschnitt). Zudem kann *in vivo* ein synergistischer Effekt durch die Gegenwart von mehreren Wachstumsfaktoren auftreten.

In vielen Studien wird die Verringerung einer hohen initialen Freisetzung des Faktors angestrebt, meistens jedoch mit dem Ziel, nicht die gesamte Menge des Faktors in der Anfangszeit freizusetzen. Tritt hingegen eine initial hohe Freisetzung für einen kurzen Zeitraum auf, könnte eine verstärkte Aktivierung und Migration von Zellen in Richtung des Scaffolds hervorgerufen werden. Aus den in der Literatur beschriebenen Daten ist nicht eindeutig zu erkennen, ob eine hohe initiale Freisetzung einen positiven, keinen oder negativen Effekt auf die Defektheilung hat. Eine hohe initiale Freisetzung von VEGF zeigte z.B. eine unterstützende Wirkung zur Bildung eines vaskulären Netzwerkes in einem ektopen Implantat in Ratten, wohingegen in derselben Studie die Freisetzung bei orthotopen Defekten keinen Effekt von VEGF auf die Vaskularisierung zeigte (Kempen et al., 2009). Ein poröses Scaffold, welches in Ratten implantiert wurde und eine hohe initiale Freisetzung mit anschließender kontrollierten Freisetzung über mehr als 2 Wochen zeigte, bewirkte die Bildung von neuen Blutgefäßen. Allerdings nahm diese erst nach 2 bis 3 Wochen sprunghaft zu (Elcin und Elcin, 2006), welches auf den Effekt der langanhaltenden Freisetzung schließen lässt. In Studien von (Du et al., 2014) mit einem Drug Delivery-System ist ersichtlich, dass eine langanhaltende Freisetzung mit geringem „initial burst“ die Einsprossung von Blutgefäßen *in vivo* in ein Scaffold förderte. Im Vergleich dazu war bei Varianten mit einer hohen initialen und danach geringen Freisetzung kein vergleichbarer Effekt zu sehen.

VEGF-Freisetzung über einen längeren Zeitraum

Bei Freisetzungsversuchen über 28 Tage wurde VEGF relativ konstant und langanhaltend (ohne bzw. mit nur sehr geringem „initial burst“) aus den Heparin-modifizierten („insitu“ und „post“) Varianten im Vergleich zur Heparin-freien Variante freigesetzt, was durch die spezifische Bindung des Wachstumsfaktors VEGF-A₁₆₅ an Heparin zu erklären ist.

In verschiedenen Studien mit unterschiedlichsten Freisetzungssystemen wurden ähnliche Freisetzungskinetiken beschrieben. Mit Heparin funktionalisierte Scaffoldtypen zeigten eine konstante Freisetzung, u.a. aus PEG-vernetzten Heparinhydrogelen (Tae et al., 2006), aus Heparin-funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln (Chung et al., 2006), aus einem Kompistmaterial mit Biozement und Kollagen modifiziert mit Heparin (Lode et al., 2008) und von Hyaluronsäure-

hydrogelen mit Heparin (Pike et al., 2006). Aber auch ohne den Einsatz von Heparin kann eine langanhaltende Freisetzung erreicht werden. In den Studien von (Farokhi et al., 2013) konnte über 28 Tage VEGF und PDGF aus Seiden/Calciumphosphat/PLGA-Scaffolds konstant freigesetzt werden. Die verzögerte Freisetzung ist hier auf das Material PLGA zurückzuführen, in dem der Faktor vermutlich durch negative Gruppe gebunden hatte und durch den Prozess des Elektrosplittings (Herstellung feiner Faserstränge) in das Material mit eingearbeitet wurde. Auch mit VEGF beladene Mikrosphären aus PLGA wiesen eine langanhaltende Freisetzung über 42 Tage auf (Zhang et al., 2014).

Die Art der Modifizierung („insitu“ und „post“) hatte bei der 7-tägigen Freisetzung keinen großen Einfluss, wobei die freigesetzte VEGF-Menge bei „insitu“-modifizierten im Vergleich zu „post“-modifizierten Scaffolds bei einem Wiederholungsversuch über 28 Tage erhöht war. Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass je mehr Heparin für die Modifizierung der Scaffolds verwendet wurde und gebunden hatte, desto weniger VEGF wurde freigesetzt. Dies trifft sowohl für die „insitu“- als auch für die „post“-Modifizierung zu, wobei der konzentrationsabhängige Unterschied in der VEGF-Freisetzung bei den „insitu“-Varianten tendenziell klarer zu erkennen war. Vermutlich liegt dieser Umstand an der geringeren Menge am Scaffold gebundenen Heparins oder mehr frei verfügbarer Bindungsstellen des nachträglich am Material gebundenen Heparins („post“). In den Arbeiten von (Lode et al., 2008) wurden vergleichbare Ergebnisse nachgewiesen, bei denen die VEGF-Freisetzung von Zementen modifiziert mit Kollagen und Heparin abhängig von der eingesetzten Heparinkonzentration war.

Die kumulative Darstellung der VEGF-Freisetzung aus nicht-modifizierten Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen zeigte eine nahezu vollständige Freisetzung des Wachstumsfaktors, während im Vergleich zu den Heparin-modifizierten Scaffolds („insitu“ und „post“) nur 13-25% der eingesetzten Menge freigesetzt wurde. Schlussfolgernd befand sich das verbleibende VEGF gebunden am Heparin-modifizierten Scaffold. Auch bei (Wissink et al., 2001) wurde unter Verwendung von vernetzten Kollagen-Matrices innerhalb von 7 Tagen 75% und nach 28 Tagen 100% des eingesetzten Wachstumsfaktors bFGF (ebenfalls ein Heparin-bindender Wachstumsfaktor) freigesetzt, während Heparin-beladene Kollagen-Matrices nur 65% freisetzen. *In vivo* binden die verschiedenen Isoformen des VEGF (auch VEGF-A₁₆₅) an die extrazelluläre Matrix und damit auch an Heparansulfat (Houck et al., 1992; Park et al., 1993; Schönherr und Hausser, 2000; Kanematsu et al., 2004) und werden durch Enzyme (z.B. Heparinasen (Houck et al., 1992; Schönherr und Hausser, 2000)) freigesetzt. Somit dient das an der extrazellulären Matrix gebundene VEGF als biologisches Reservoir um, wenn nötig verschiedene Zelltypen nach der Freisetzung zu mobilisieren und um die Wachstumsfaktoren vor enzymatischer Degradation und Hydrolyse in der Matrix zu schützen (Schönherr und Hausser, 2000; Kanematsu et al., 2004). Es ist möglich, dass der natürliche Prozess *in vivo*, welcher für die Freisetzung aus der extrazellulären Matrix verantwortlich ist, auch das verbleibende VEGF von Heparin-

modifizierten Scaffolds nach einer Implantation freisetzen kann. An der extrazellulären Matrix gebundenes, nicht freigesetztes, VEGF unterstützte in den *in vitro* Studien von (Park et al., 1993) das Wachstum von Endothelzellen.

Allerdings wurde in einem Freisetzungsexperiment über 28 Tage nur 40% des eingesetzten VEGF freigesetzt, welches im Gegensatz zum Ergebnis der vollständigen VEGF-Freisetzung aus der Heparin-freien Variante über 7 Tage in einem vorhergehenden Versuch steht. Der überwiegende Anteil des eingesetzten VEGF musste demnach noch am Scaffold gebunden gewesen sein. Für diese beiden Versuche wurden die Scaffolds aus verschiedenen Kollagenchargen hergestellt. Vermutlich hatte sich das Kollagen und damit die Morphologie und die Zusammensetzung des Materials über die Zeit geändert, was bei der Analyse im REM bzw. bei der Bestimmung des Mineralgehaltes aber nicht zu erkennen gewesen war. Dies könnte die Ursache für die veränderte Freisetzungskinetik gewesen sein.

Durch die Modifizierung der Scaffolds mit Heparin konnte im Vergleich zu Heparin-freien Varianten erfolgreich die initial hohe Freisetzung reduziert bzw. unterdrückt werden und VEGF wurde langanhaltend verzögert freigesetzt. Damit scheinen die Heparin-modifizierten Scaffolds als Drug Delivery-System für Wachstumsfaktoren wie VEGF geeignet zu sein.

Biologische Aktivität des freigesetzten VEGF

In dieser Arbeit wurde neben der quantitativen Bestimmung des freigesetzten VEGF aus Heparin-modifizierten und Heparin-freien Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen mittels ELISA auch die biologische Aktivität des freigesetzten VEGF bestimmt. Eine langanhaltende und kontinuierliche Freisetzung, welche in dieser Arbeit mit den Heparin-modifizierten Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen erzielt werden konnte, birgt das Risiko, dass der Wachstumsfaktor über die Kultivierungszeit durch Degradation an biologischer Aktivität verliert. Die Bindung des Wachstumsfaktors VEGF an Heparin schützt hierbei den Faktor vor Degradation, stabilisiert diesen vermutlich durch Konformationsänderungen der Struktur und verzögert zusätzlich die Freisetzung (Gitay-Goren et al., 1992; Berleau, 1996; Capila und Linhardt, 2002; Tayalia und Mooney, 2009; Balasubramanian et al., 2010; Chen et al., 2010a). Gerade im Bereich der Knochenregeneration kann eine langanhaltende Freisetzung die Effektivität von Wachstumsfaktoren durch den simultanen Einfluss auf die Angiogenese und Osteoblastendifferenzierung erhöhen (Gerber et al., 1999; Gerber et al., 1999; Mayr-Wohlfart et al., 2002; Street et al., 2002). In den Studien von (Wernike et al., 2010) unterstützte eine Freisetzung von VEGF über 28 Tagen aus Calciumphosphatkeramiken, implantiert in Schädeldefekten von Mäusen, die Vaskularisierung, Osseointegration und die Knochenbildung. Auch in noch nicht veröffentlichte Arbeiten von Stefan Zwillingenberger (2014) führten BMP-2 beladene Scaffolds, welche den in dieser Arbeit verwendeten „post“-Scaffolds (P-75) entsprechen, *in vivo* nach 6 Wochen zu einer gesteigerten Kallus-Bildung in Mäusen im Gegensatz zur Kontrolle.

Um den Erhalt der biologischen Aktivität von VEGF zu bestimmen, gibt es verschiedene Möglichkeiten, indem z.B. die proliferationsstimulierende Wirkung (Lode et al., 2008; Yang et al., 2014), chemoattraktive Effekte (Green et al., 2009; Gabrielyan et al., 2014) oder die angiogene Wirkung durch die Ausprossung von Gefäßen (Gerhardt, 2003; Jin et al., 2011; You et al., 2013) oder Bildung eines tubulären Netzwerkes aus Endothelzellen oder andere Zelltypen (Geritsen et al., 2003; Yadav et al., 2012; Chwalek et al., 2014) untersucht wird.

In dieser Arbeit wurde der Erhalt der biologischen Aktivität des freigesetzten VEGF anhand von Proliferationsassays nachgewiesen. Hierbei wurde die Wirksamkeit des freigesetzten VEGF aus Heparin-freien mit dem aus Heparin-modifizierten Scaffolds verglichen. Zusätzlich wurde eine VEGF-Kalibriergerade mitgeführt, bei der definierte Konzentrationen von „frischem“ VEGF dem Zellkulturmedium hinzugefügt wurden und anschließend die Zunahme der Zellzahl innerhalb einer dreitägigen Inkubationszeit bestimmt wurde. Ein Bereich von 10-17 ng VEGF/ml war dabei optimal für die Proliferation von HDMEC. Es ist sehr schwierig anhand der Datenlage eine vergleichbare Aussage zu der in dieser Arbeit erzielten Wirksamkeit von VEGF zu treffen. Sehr viele Parameter (u.a. das Scaffoldsystem, der Versuchsaufbau, verschiedene Zelltypen, unterschiedliche Zellreaktionen) beeinflussen hierbei die konzentrationsabhängige Wirkung von VEGF. Um einige Beispiele zu nennen, wurden in Arbeiten von (Chung et al., 2009) Konzentrationen im Bereich von 20-60 ng VEGF/ml (immobilisiert auf Kollagenscaffolds) untersucht, die zu einer Steigerung der Zellzahl führte. Ein ähnliches System nur mit höheren Konzentrationen im Bereich von 50-100 ng VEGF/ml führte in Studien von (Shen et al., 2008) zu einer Zunahme der Zellzahl, während in Arbeiten von (Aizawa et al., 2010) sogar 500 bis 1000 ng VEGF/ml in Lösung und immobilisiert in einem Agarosegel eingesetzt wurden. Niedrigere Konzentrationen an VEGF führten in der Studie von (Aizawa et al., 2010) dagegen zur Chemoattraktion (Migration der Zellen), ausgelöst durch einen Wirkstoffgradienten. Bei einer vergleichbaren Arbeit wurden Konzentrationen von 400 ng VEGF pro Scaffold verwendet, um die biologische Aktivität von VEGF zu testen. Das aus den Scaffolds freigesetzte VEGF wurde anschließend auf die Zellen gegeben. Dabei war die Zunahme der Proliferation signifikant höher als bei Scaffolds ohne VEGF (Lode et al., 2008). In Studien von (Chung et al., 2009) wurde auch eine Steigerung der Zellproliferation mit freigesetztem VEGF aus Heparin-modifizierter, demineralisierter Knochenmatrix im Vergleich zu Scaffolds ohne VEGF nachgewiesen.

Im Nachfolgenden wird diskutiert, inwiefern die metabolische Aktivität des eingesetzten VEGF im Kultivierungszeitraum die Proliferation der Zellen stimulierte, in welchem Konzentrationsbereich die Zellen reagierten und ob Heparin bei den modifizierten Scaffolds einen Einfluss auf die biologische Aktivität des freigesetzten VEGF hatte.

Durch die Heparin-Modifizierung („insitu“ und „post“), sowie die unterschiedlichen, eingesetzten Heparinkonzentrationen, war die Menge an freigesetztem VEGF nach 24 h im Vergleich zur

Heparin-freien Variante deutlich reduziert. Dieser Unterschied in der freigesetzten VEGF-Menge aus den Heparin-modifizierten Scaffolds korreliert vermutlich mit einer niedrigeren Zellzahl im Vergleich zur Heparin-freien Variante. Es fiel aber auf, dass bei der Variante I-30 nur 1/6 der Menge an VEGF im Gegensatz zur Heparin-freien Variante freigesetzt wurde, die Zunahme der Zellproliferation jedoch nur leicht reduziert war.

Wie bereits die VEGF-Kalibriergerade zeigte, gibt es einen Zusammenhang in der linearen Zunahme der Zellzahl mit steigender VEGF-Konzentration. Dabei befinden sich die 35 ng VEGF/ml, freigesetzt von der Heparin-freien Variante, außerhalb des optimalen Bereiches und die Zellzahl nimmt damit mit steigender VEGF-Konzentration nicht weiter zu. Freigesetztes VEGF bewirkte, trotz stark unterschiedlicher Konzentrationen (mit 6 ng/ml aus I-30 vs. 35 ng/ml aus der Heparin-freien Variante), eine ähnliche Zunahme der Zellzahl. Auch scheint mehr freigesetztes VEGF bei der Variante I-75 im Vergleich zu I-150 zu einer Steigerung der Zellzahl geführt zu haben.

Bei den „post“-Varianten wurden nach 24 h annähernd gleiche VEGF-Mengen freigesetzt, woraufhin die Zunahme der Proliferation zwischen den Varianten kaum zu unterscheiden war.

Nach 7 Tagen war die Zunahme der Zellproliferation mit freigesetztem VEGF im Medium der Heparin-modifizierten-Varianten (mit Ausnahme von P150) höher als bei der Heparin-freien Variante. Obwohl die freigesetzte VEGF-Menge im Medium mit 2,1 ng VEGF/ml bei der Heparin-freien Variante im Konzentrationsbereich (1,3 bis 2,5 ng/ml) der „insitu“-Varianten liegt, führte dies nicht zu einem ähnlichen Anstieg der Zellzahl. Demzufolge ist hier eine reine konzentrationsabhängige Proliferationssteigerung durch VEGF nicht gegeben, was darauf hindeutet, dass es einen weiteren Einflussfaktor gab.

Auch bei den „post“-Varianten, mit Ausnahme von P-150, war die Zunahme der Zellproliferation im Vergleich zur Heparin-freien Variante erhöht, obwohl die freigesetzte VEGF-Menge der Varianten in einem ähnlichen Konzentrationsbereich (1,7 bis 2,8 ng/ml) lag.

Die durchgeführten Versuche waren erfolgreich und die Ergebnisse hatten gezeigt, dass das aus den Scaffolds freigesetzte VEGF auch nach 7 Tagen noch metabolisch aktiv war und die Zellen stärker proliferierten als mit Medium ohne VEGF. Zudem konnte auch nachgewiesen werden, dass Heparin einen Einfluss auf die Wirksamkeit der biologischen Aktivität des VEGF hatte, was im nachfolgenden Abschnitt näher diskutiert wird.

Einfluss von Heparin auf die biologische Aktivität des freigesetzten VEGF

Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass Heparin einen positiven Effekt auf die metabolische Aktivität des freigesetzten Wachstumsfaktors haben könnte. Um den Einfluss näher aufzuklären, wurden die ermittelten Werte zur Menge des freigesetzten VEGF und zur Zunahme der

Zellproliferation mit einer Kontrollreihe (mit VEGF-Konzentrationen im Bereich von 0-6 ng VEGF/ml) verglichen (Abbildung 35).

Heparin führte bei den modifizierten Varianten zu einem positiven Effekt auf die biologische Aktivität von VEGF und damit zu einer Zunahme der Proliferation von Endothelzellen im Vergleich zum freigesetzten VEGF aus Heparin-freien Scaffolds. Eine Steigerung der mitogenen Aktivität von Zellen wurde bereits in vielen Studien mit Heparin-modifizierten Biomaterialien und dem Wachstumsfaktor VEGF dargestellt. In der Arbeit von (Wolf-Brandstetter et al., 2006) wurden die Freisetzung und biologische Aktivität von VEGF, freigesetzt aus Titanimplantaten beschichtet mit Kollagen und Heparin, untersucht. Hierbei führten *in vitro* 2 ng freigesetztes VEGF/cm² aus den Heparin-modifizierten Implantaten im Vergleich zu reinen Titanimplantaten zu einer Steigerung der mitogenen Aktivität. Auch Studien von (Steffens et al., 2004) zeigten durch die Freisetzung von VEGF von Heparin-haltigen Kollagenmatrices eine gesteigerte Proliferation und Kapillarbildung von Endothelzellen im Gegensatz zu Heparin-freien Kollagenmatrices. In der Arbeit von (Berleau, 1996) konnte für die Isoform VEGF-A₁₆₅ gezeigt werden, dass der Verlust der Heparin-Bindung (durch alternatives Spleißen der RNA oder enzymatische Spaltung durch Plasmin) zu einer erheblichen Reduktion der mitogenen Aktivität von Endothelzellen führte. Des Weiteren wurde durch die Verwendung von Heparinasen (Spaltung von Heparin) gezeigt, dass die spezifische Bindung von VEGF an Heparin eine entscheidende Rolle für die biologische Aktivität spielt. Hierbei wurden Heparin-verwandte Moleküle auf der Zelloberfläche mit Heparinasen gespalten, welches zu einer Inhibierung der VEGF-Bindung (Gitay-Goren et al., 1992) führte und eine Reduzierung der Proliferation von Endothelzellen und *in vivo* Neovaskularisierung bewirkte (Sasisekharan et al., 1994). Bei Zugabe von löslichem Heparin war eine Bindung von VEGF an die Rezeptoren wieder möglich (Gitay-Goren et al., 1992). In der Studie wird folglich angenommen, dass die Heparin-verwandten Moleküle auf der Zelloberfläche für die Bindung von VEGF an die Rezeptoren essentiell sind. In einer anderen Arbeit von (Brouwer et al., 2013) konnte zudem *in vivo* das Einwachsen von Blutgefäßen in die Implantationsstelle durch die Anwendung einer Kollagenmatrix mit an Heparin gebundenen Wachstumsfaktoren (u.a. VEGF) beschleunigt werden. Durch diese Studien wird deutlich, dass VEGF durch die Bindung an Heparin über einen längeren Zeitraum stabilisiert und vor enzymatischer Degradation geschützt wird und teilweise biologisch aktiver ist, als ungebundenes, lösliches VEGF. *In vivo* ist es natürlich, dass VEGF an Heparin bzw. Heparin-ähnlichen Domänen von Proteoglykanen bindet, welches für die Stabilisierung und Lagerung des Wachstumsfaktors, als auch für die Bindung von VEGF-A₁₆₅ an Rezeptoren essentiell ist (Gitay-Goren et al., 1992; Park et al., 1993; Tessler et al., 1994; Taipale und Keski-Oja, 1997; Schuch et al., 2002; Ashikari-Hada et al., 2005).

Allerdings gab es Unterschiede in der biologischen Aktivität des freigesetzten VEGF aus den verschiedenen modifizierten Scaffolds. Das in die Struktur eingebaute und mit EDC vernetzte Heparin („insitu“-Modifizierung) zeigte im Vergleich zum nachträglich gebundenen Heparin („post“-Modifizierung) eine gesteigerte Aktivität des freigesetzten VEGF nach 7-tägiger Inkubation. Durch die Bestimmung des Heparingehaltes in den Scaffolds konnte gezeigt werden, dass sich während der Kultivierungszeit (beruhend auf den Daten nach 28-tägiger Inkubationszeit) Heparin von den Scaffolds ablöste, wobei tendenziell mehr Heparin von Scaffolds mit höherem Heparingehalt (75/150 mg Heparin/g min. Koll.) freigesetzt wurde. Ein großer Unterschied des abgelösten Heparingehaltes war jedoch zwischen den „insitu“- und „post“-modifizierten Varianten nicht zu erkennen. Es könnte dennoch sein, dass dieses freigesetzte Heparin mit VEGF einen Komplex bildet oder direkt ein Heparin/VEGF-Komplex vom Scaffold freigesetzt wird, welcher eine gesteigerte biologische Aktivität bei der Bindung an Zellrezeptoren aufweist. Auch könnte Heparin, welches dem Medium hinzugegeben wurde, einen solchen Komplex mit freigesetztem VEGF eingegangen sein.

Die Heparin-bindende Domäne befindet sich in der Nähe der VEGF-Rezeptor-bindenden Domäne der VEGF-Aminosäuresequenz und ermöglicht durch Interaktionen eine Komplexbildung von Heparin mit VEGF. Diese VEGF/Heparin-Bindung stabilisiert eine bioaktive homodimerische Quartärstruktur (Robinson und Stringer, 2001). In Arbeiten der Gruppe von (d' Angelo et al., 2013) wurden VEGF und VEGF/Heparin-Komplexe (0,1 µg Heparin/mg PLGA) in PLGA-basierten Mikrosphären eingekapselt. Hierbei wurde nachgewiesen, dass eingekapseltes VEGF ohne Heparin einen größeren Effekt auf die Ausbildung von tubulären Endothelzellstrukturen nach 24 h hatte, während bei der Variante mit Heparin/VEGF-Komplexen scheinbar erst bei längerer Inkubation (48 und 72 h) die Bindung von Heparin VEGF stabilisierte und die Bildung von tubulären Strukturen im Vergleich zur Variante mit VEGF ohne Heparin stärker förderte. Anscheinend beeinflusst aber auch die Heparinkonzentration die Bindung von VEGF an die Rezeptoren. So konnte in den Studien von (Gitay-Goren et al., 1992) gezeigt werden, dass geringe Konzentrationen an Heparin (0,1-1 µg/ml) im Vergleich zu hohen Konzentrationen (10-1000 µg/ml) die Bindung an die VEGF-Rezeptoren der Zellen unterstützten. Die Bindung von VEGF an einen Rezeptor, welcher anschließend einen Komplex mit einer Größe von 225 kDa (verursacht durch hohe Heparinkonzentrationen) bildete, war dabei weniger sensitiv gegenüber Heparin. Im Vergleich dazu unterstützen niedrige Heparinkonzentrationen die Bindung von VEGF an den Rezeptor, während ein VEGF/Rezeptor-Komplex von nur 170 kDa gebildet wurde. Die Nachweisgrenze des in dieser Arbeit verwendeten DMMB-Assays zur Bestimmung der freigesetzten Heparinmenge aus den Scaffolds war zu hoch, um Konzentrationen im Bereich von µg/ml nachzuweisen. Dadurch war ein positiver oder negativer Effekt der freigesetzten Heparinmenge auf die biologische Aktivität von VEGF nicht feststellbar.

Eine andere Überlegung ist ein möglicher förderlicher Einfluss der zusätzlichen Vernetzung von Heparin mit EDC bei den „insitu“-modifizierten Scaffolds auf die biologische Aktivität von VEGF. In Studien der Gruppe (Steffens et al., 2004) wurden Kollagenmatrices mit Heparin modifiziert, die mit unterschiedlichen Mengen an EDC (0,2 bis 2 mg/500 µl) vernetzt wurden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Menge an eingesetztem EDC (bei gleichbleibendem Heparin Gehalt und gleicher VEGF-Konzentration) die Zellproliferation *in vitro* und die Anzahl der gebildeten Kapillaren in der Matrix *in vivo* gesteigert wurden. Somit könnte auch EDC bei der Vernetzung der „insitu“-modifizierten Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen einen positiven Einfluss auf Heparin durch eine mögliche Aktivierung von funktionellen Gruppen gehabt haben, welches später die biologische Aktivität des freigesetzten VEGF erhöhte.

Zusammenfassend wurde nachgewiesen, dass die Heparin-Modifizierung („insitu“ und „post“) im Gegensatz zu Heparin-freien Varianten, die VEGF-Freisetzung langanhaltend verzögerte und die biologische Aktivität des freigesetzten VEGF steigerte. Besonders „insitu“-modifizierte Varianten zeigten eine erhöhte biologische Aktivität durch einen möglichen Einfluss von Heparin und der EDC-Vernetzung im Vergleich zu „frischem“ VEGF, dass direkt dem Zellkulturmedium zugesetzt worden war.

Einfluss von Heparin auf das Knochengewebe *in vivo*

In der Literatur gibt es Hinweise, dass Heparin – vor allem bei hohen Konzentrationen und langanhaltender Dosis – im Bereich der Knochenregeneration einen negativen Einfluss hat. Es wurde nachgewiesen, dass Heparin die Bindung von OPG an Osteoblasten inhibiert und vermutlich dadurch die OPG-vermittelte Regulierung der Osteoklastenaktivität stört, wodurch es zu einer gesteigerten Aktivität von Osteoklasten kommt (Irie et al., 2007). Bei der systemischen Gabe von Heparin im Bereich von 10.000-30.000 U/Tag über einen längeren Zeitraum von 6 Monaten, um Thromboembolien zu verhindern, wiesen in Studien von (Griffith et al., 1965) 1 Patient (n=10) bzw. von (Hawkins und Evans, 2005) 3 Patienten (n=100) plötzliche Frakturen und eine Abnahme der Knochendichte auf. Als Ursache wird in der Studie von (Hawkins und Evans, 2005) vermutet, dass Heparin im Körper viel Calcium bindet und dadurch die Produktion von PTH anregt, welches wiederum die Osteoklastenaktivität steigert, was zu Knochenfrakturen führen kann. Auch bei Ratten führte die Verabreichung von Heparin (1 U/g/Tag, entspricht ca. 60.000-90.000 U/Tag beim Menschen) innerhalb von 8 Wochen zu einer starken Abnahme der Knochendichte (32% Verlust der trabekulären Knochenoberfläche) (Muir et al., 1997). Allerdings gibt es auch zahlreiche Studien, die keinen Effekt bei der Verabreichung von Heparin auf die Knochendichte feststellten. Hohe Dosen von Heparin (250 U/Kg/Tag) zeigten in Versuchen mit Hunden über 2 Jahre keinen Effekt auf den Mineralgehalt des Knochens. Auch Studien von (Curcelli et al., 2005) zeigten keinen Effekt bei der Gabe von unterschiedlichen Heparin-

konzentrationen in Ratten. In Arbeiten von (van der Wiel et al., 1993) wurde der Einfluss von Heparin über einen kurzen Zeitraum untersucht, bei dem die Verabreichung von 2 x 5000 U/Tag Heparin bei männlichen Patienten zu keiner Abnahme der Knochendichte führte. Auch eine andere *in vivo* Studie von (Johnson et al., 2011) mit Heparin-modifiziertem Biomaterial konnte keinen negativen Effekt von Heparin auf die Knochendichte nachweisen. Hierbei wurden Kollagenscaffolds mit Heparin und BMP-2 in Femurdefekten von Ratten implantiert, welche zu einer gesteigerten Knochenbildung nach 8 Wochen im Vergleich zu Scaffolds aus unmodifiziertem Kollagen führten. *In vitro* konnte außerdem festgestellt werden, dass Heparin die Adhäsion und Aktivität von Osteoklasten inhibiert (Baud'huin et al., 2011).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sehr hohe und tägliche Dosen (>10.000 U) im Menschen zu einem Abbau von Knochengewebe führen, wohingegen geringe Dosen (<5.000 U) über kurze Zeit keinen Effekt haben. Die eingesetzte Menge an Heparin bei den Scaffoldmaterialien (max. 140 U/Scaffold) sollte diesbezüglich keinen negativen Effekt auf die Knochendichte bzw. Aktivität der Osteoklasten beim Abbau des Scaffoldmaterials *in vivo* haben.

5.2 VEGF-haltige Depots in Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen

Zur Etablierung eines neuen Drug Delivery-Systems wurde in dieser Arbeit der Modellwachstumsfaktor VEGF-A₁₆₅ zusammen mit verschiedenen Depotkomponenten in Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen injiziert. Das Ziel eines VEGF-haltigen Depots im Zentrum des Scaffolds war die Ausbildung eines Wirkstoffgradienten, um regenerativ wirksame Zellen mittels Chemoattraktion – im Sinne des *in situ*-Tissue Engineerings – in das Innere des Scaffolds zu locken. Des Weiteren wurde die VEGF-Freisetzung aus einem Depot durch die Verwendung von verschiedenen Komponenten (u.a. Alginat und Heparin) unterschiedlich stark verzögert. Durch eine gerichtete und langanhaltende Freisetzung sollte die Einprossung von Blutgefäßen (Vaskularisierung) in das modifizierte Material gefördert und somit die Defektheilung im Knochen insgesamt beschleunigt werden.

Um ein VEGF-haltiges Depot im Scaffold aus mineralisiertem Kollagen zu erzeugen, wurde eine Lösung aus VEGF und verschiedenen Komponenten mittels einer elektrischen Pipette und einer speziellen Spitze mit einer dünnen Kanüle in das Scaffold injiziert. Die Auswahl der verwendeten Komponenten umfasste neben PBS/BSA (als Kontrolle), Heparin, Alginat, Hyaluronsäure und Methylcellulose. Diese wurden ausgewählt, um einerseits VEGF spezifisch zu binden (Heparin), andererseits durch eine Vernetzung (Alginat mit Calcium-Lösung) oder durch eine verzweigte Molekülstruktur (Hyaluronsäure und Methylcellulose) VEGF physikalisch verzögert freizusetzen.

In den nachfolgenden Abschnitten werden die erhaltenen Ergebnisse bezüglich des optischen Nachweis der Depotkomponenten im Scaffold, der Bildung eines Wirkstoffgradienten anhand von Fluoreszenz-markiertem VEGF, der VEGF-Freisetzung aus den Depots und der biologischen Aktivität des freigesetzten VEGF und der Migration von Endothelzellen in Richtung eines VEGF-haltigen Depots diskutiert.

5.2.1 Nachweis der Depot-Komponenten

Um die Stabilität der injizierten Depotkomponenten im Scaffold aus mineralisiertem Kollagen während einer 28-tägigen Inkubation unter Zellkulturbedingungen festzustellen, wurden die Komponenten durch verschiedene Färbereagenzien angefärbt. Durch den optischen Nachweis ließen sich zudem Rückschlüsse auf die VEGF-Freisetzung ziehen.

Die injizierte Komponente **Heparin** schien auch nach 28-tägiger Inkubation stabil zu sein, welches auf die sehr gute Bindung des Heparins am Kollagen (Mathews, 1965; Öbrink, 1973) bzw. HAP (Embery et al., 1979; Rees et al., 2002; Lode et al., 2008) zurückzuführen ist. In Versuchen dieser Arbeit konnte diese starke Bindung von Heparin an Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen bestätigt werden (siehe 4.1.1).

Im Gegensatz zu Heparin wurden wahrscheinlich **Hyaluronsäure** und **Methylcellulose** (aufgrund einer unspezifischen Bindung des Farbstoffes am Scaffold war es nicht nachweisbar) über 28 Tage größtenteils freigesetzt, wobei die Komponenten vermutlich nur schwach mit dem Scaffoldmaterial aus Kollagen und Mineral interagierten. Aus der Literatur ist bekannt, dass Hyaluronsäure nicht an Kollagen bindet (Öbrink, 1973) und nur eine schwache Bindung mit HAP aufweist (Boskey und Dick, 1991). Auch wenn Methylcellulose im Scaffold durch die Anfärbung nicht nachweisbar war, konnte in den Arbeiten von (Garrett et al., 2007) gezeigt werden, dass Methylcellulose an Kollagen bindet.

Die Komponente Alginat wurde mit Calcium vernetzt, um das injizierte Hydrogeldepot zu stabilisieren. Hierbei zeigte sich, dass durch die Vernetzung des Alginates die Depots aus **Alginat** und **Alginat + Hyaluronsäure** auch nach längerer Inkubation noch nachweisbar und damit teilweise stabil waren. Die Hydrogelkomponente Alginat interagiert vermutlich zusätzlich mit HAP, indem entweder weitere Ca^{2+} -Ionen der Mineralphase vom Alginat komplexiert werden, wobei die Struktur gefestigt wird (Tønnesen und Karlsen, 2002; Stancu et al., 2011) oder andererseits erfolgt möglicherweise auch eine Aufnahme von Ca^{2+} -Ionen aus dem Alginathydrogel durch das mineralisierte Kollagen des Scaffoldmaterials, wie es in der Studie von (Bernhardt et al., 2009a) vermutet wurde. Unter Zellkulturbedingungen (2,2 mM Ca^{2+} im Medium) sind Alginatgele bei vorheriger Vernetzung mit 0,1 M Calciumchlorid stabil. Das Depot aus **Alginat + Heparin** scheint durch die Bindung von Heparin an Kollagen und HAP besonders stabil zu sein. Die Kombination aus **Alginat + Methylcellulose** konnte aufgrund der unspezifischen Bindung des Farbstoffes am Scaffold nicht nachgewiesen werden. Unter Punkt 5.2.3 wird der Einfluss der Stabilität des injizierten Depots auf die VEGF-Freisetzung weiter diskutiert.

5.2.2 Optischer Nachweis zur Bildung eines Wirkstoffgradienten

Fluoreszenz-markiertes VEGF (FITC-VEGF) wurde mit den Depotkomponenten in das Scaffold injiziert, um den Wachstumsfaktor innerhalb des Scaffolds nach kurzer (10 min, 24 h) und längerer Inkubationszeit (7 d) nachzuweisen und um die Bildung eines Wirkstoffgradienten feststellen zu können.

Bei der **Kontrollvariante** (ohne Depot) fehlten spezifische Bindungen an VEGF bzw. physikalische Barrieren (wie eine vernetzte Hülle, viskoses Material), so dass die Intensität des Fluoreszenzsignals bereits innerhalb von 24 h stark nachließ und somit das VEGF weitgehend aus dem Material herausdiffundiert war. Dennoch scheint ein kleiner Teil der eingesetzten Menge an VEGF am Material gebunden zu haben, wodurch der gesamte Scaffold auch am Tag 7 noch eine gewisse „Hintergrundstrahlung“ aufwies.

Bei den Varianten mit **Hyaluronsäure** und **Methylcellulose** diffundierte der Faktor verzögert aus dem Scaffolds und es bildete sich nach 24 h ein Wirkstoffgradient aus (starke Intensität des Faktors im Depot (im Zentrum des Scaffolds) und leichte Intensität außerhalb des Depots).

Hydrophile Proteine diffundieren typischerweise innerhalb von 24 h aus einer nicht modifizierten Hyaluronsäure- oder Methylcellulosebasierende Matrix (Pakulska et al., 2012). Scheinbar interagiert FITC-VEGF nach der Freisetzung aus dem injizierten Depot aber mit dem Scaffoldmaterial Kollagen/HAP und die Freisetzung könnte zusätzlich durch eine physikalische Barrierewirkung der injizierten Komponenten verlangsamt worden sein. Eine physikalische Verzögerung konnte durch den optischen Nachweis der Depotkomponente Hyaluronsäure bestätigt werden, wobei Hyaluronsäure nach 3 Tagen noch schwach detektiert werden konnte, aber nach 28 Tagen nicht mehr nachweisbar war.

Durch die spezifische Bindung von Heparin an FITC-VEGF war das injizierte Depot bei der Variante **Alginate + Heparin** (im Vergleich zur Kontrollvariante und den Varianten mit Hyaluronsäure bzw. Methylcellulose) auch nach längerem Zeitraum sichtbar und es hatte sich ein Wirkstoffgradient ausgebildet. Zusätzlich wurde die Diffusion des Faktors aus dem Scaffold durch die Vernetzung der Alginatekomponente stark verzögert, welches sich bei der Variante mit injiziertem **Alginate** zeigte.

Die Ergebnisse mit dem Fluoreszenz-markiertem VEGF korrelieren sehr gut mit den Resultaten des optischen Nachweises der Depotvarianten. Die Hyaluronsäurekomponente war nach 3 Tagen noch nachweisbar, wie auch die stärkere Intensität des FITC-VEGF im Zentrum des Scaffolds bestätigte. Bei der Variante Alginate + Heparin war das Depot selbst nach 28 Tagen (der Nachweis erfolgte mit Hilfe einer Färbereagenz) noch stabil, wie auch die Versuche mit FITC-VEGF nach 7 Tagen zeigten. Dies lässt den Schluss zu, dass für die Ausbildung eines Wirkstoffgradienten im Scaffold die injizierten Komponenten sowie die „Stabilität“ des Depots eine entscheidende Bedeutung haben. Diffundieren die Komponenten aus dem Scaffold heraus, so scheint auch der Wachstumsfaktor beschleunigt freigesetzt zu werden und nur geringfügig am mineralisierten Kollagen der Scaffolds zu binden.

5.2.3 VEGF-Freisetzung

Wie sich bereits bei der nicht-modifizierten Scaffoldvariante (Heparin-frei) feststellen ließ (siehe 4.1.5, Abbildung 30), wurde VEGF innerhalb von 7 Tagen nahezu vollständig freigesetzt. In den in diesem Abschnitt diskutierten Depotversuchen wurde auch bei der Kontrollvariante – die Injektion einer VEGF-Lösung (ohne weiteres Biopolymer, welches die Freisetzung verzögern würde) in das Innere der Scaffoldmaterialien – das VEGF sehr schnell und mit einer hohen initialen Konzentration freigesetzt. Der Effekt einer hohen initialen Freisetzung auf die Zellen ist in der Literatur nicht genau beschrieben. Allerdings ist bei dieser Freisetzungskinetik die verbleibende Menge des Faktors für eine langanhaltende Freisetzung stark verringert. Um die Freisetzung von VEGF zu regulieren und den Wachstumsfaktor möglichst langanhaltend freizusetzen, wurden verschiedene Depotkomponenten in das Scaffold aus mineralisiertem Kollagen injiziert.

Depot-Varianten der Gruppe 1

Die Biopolymere der Gruppe 1 (Heparin, Hyaluronsäure und Methylcellulose), welche als Depot in das Scaffoldinnere injiziert wurden, zeigten eine teilweise stark veränderte Freisetzungskinetik von VEGF im Vergleich zur **Kontrollvariante (ohne Depot)**. Hierbei wurde zwar eine ähnlich hohe initiale (Variante **MC**) bzw. niedrigere Freisetzung (Variante **HYA**) erzielt, aber das Maximum der freigesetzten Menge bei beiden Varianten war zeitlich um 24 h verschoben. Wie bereits zuvor beschrieben, ist aus der Literatur nicht bekannt, ob eine initial hohe Freisetzung *in vivo* positiv auf die Zellen wirken kann. Während der frühen Entzündungsphase gibt es eine hohe proteolytische Aktivität (Martin, 1997), wodurch Wachstumsfaktoren unspezifisch durch Proteasen abgebaut werden. Es ist somit vorstellbar, dass durch den zeitlich verschobenen „initial burst“, hin zur Phase des langsamen Abklingens der Entzündungsreaktion im Körper, das freigesetzte VEGF weniger stark proteolytisch angegriffen wird und damit eine bessere Wirkung erzielen kann.

Beim optischen Nachweis mit FITC-VEGF war außerdem zu erkennen, dass eine hohe Freisetzung von VEGF aus dem Scaffold mit der Auflösung des injizierten Depots einhergeht.

Wie beschrieben fehlt es an einer spezifischen Bindung mit den Komponenten Methylcellulose und Hyaluronsäure, welche damit nur geringfügig mit VEGF interagieren. So wurden in den Arbeiten von (Ji et al., 2010) 50% des eingesetzten Wachstumsfaktors VEGF aus einem 3% Methylcellulosegel (Methocel™) innerhalb von 24 h freigesetzt. Auch eine Kombination von Methylcellulose und Hyaluronsäure als injizierbares Hydrogel führte zu einer vollständigen Freisetzung des Arzneistoffes Nimodipin in löslicher Form innerhalb von 8 h (Wang et al., 2009). Vermutlich gibt es eine physikalische Barriere durch die Komponenten Hyaluronsäure und Methylcellulose und somit eine Behinderung der Freisetzung von VEGF durch die gequollenen, langkettigen Biopolymere. In dieser Arbeit könnte ein physikalischer Effekt zumindest anfänglich die Freisetzung verzögert haben, wobei sich bei fortschreitender Kultivierungsdauer (siehe Abbildung 38) nachweislich die Depots auflösten und die Komponenten vermutlich aus dem Scaffold herausdiffundierten. Auch relativ schwache Interaktionen von VEGF mit dem Scaffoldmaterial Kollagen und HAP scheinen für eine verlangsamte Freisetzung des VEGF von Bedeutung zu sein.

Eine Problematik *in vivo* ist die Degradation von unmodifizierter Hyaluronsäure durch Hyaluronidasen in kürzester Zeit, welches dadurch zu einer beschleunigten Freisetzung des Faktors führt. Eine Vernetzung der Hyaluronsäure durch Kupplungsreagenzien, Photoinitiatoren, komplexe chemische Modifikationen – das modifizierte Material könnte anschließend cytotoxische Eigenschaften aufweisen – oder eine Diels-Alder-Reaktion (Nimmo et al., 2011) könnte hierbei die Freisetzung verzögern. In den Arbeiten von (Shu et al., 2004) wurde eine Thiol-modifizierte Hyaluronsäure mit PEG vernetzt und das Gel war nach der Implantation in Mäusen nach 8 Wochen noch nicht abgebaut. Eine Modifizierung der Komponente Hyaluronsäure zur spezifischen Bindung von VEGF wäre auch in dieser Arbeit möglich gewesen. Ein negativer Einfluss auf die

biologische Aktivität von VEGF durch eine Vernetzung von Hyaluronsäure wurde in Studien von (Peattie et al., 2004; Wang et al., 2011) nicht beobachtet. Allerdings verkompliziert sich dadurch das schon recht komplexe System aus Kollagen/HAP und injizierbarem Depot aus Hyaluronsäure und Wachstumsfaktor zusätzlich. Des Weiteren dürfte eine „vorher“ funktionalisierte Komponente nicht zu viskos werden, da sonst eine Injizierung dieser Komponente in das Scaffold nicht mehr möglich wäre. Eine nachträgliche Modifizierung der Komponente im Scaffold scheint ungünstig aufgrund einer möglicherweise ungünstigen Veränderung der Biokompatibilität des Scaffoldmaterials.

Systeme wie ein Netz aus PCL (Poly-caprolacton)/Kollagen mit Hyaluronsäure, beladen mit VEGF (Ekaputra et al., 2011) oder ein vernetztes Hyaluronsäuregel mit PLGA-Mikrosphären, welche mit VEGF beladen waren, konnten hierbei VEGF stabil (ca. 20-30% innerhalb der ersten 6 Tage) und langanhaltend freisetzen (Wang et al., 2011).

Im Vergleich zur Kontrollvariante und den Varianten mit Hyaluronsäure und Methylcellulose wies die Variante mit **Heparin** erwartungsgemäß keine anfänglich hohe Freisetzung des injizierten VEGF auf. Durch die spezifische Bindung an Heparin im Depot wurde VEGF konstant und in niedriger Konzentration (4 ng/ml) über den Zeitraum von 7 Tagen freigesetzt. Das Besondere hierbei ist, dass nach der Injizierung der Komponenten Heparin am Material aus Kollagen/HAP bindet und über 28 Tage auch optisch nachweisbar war. Somit diffundiert Heparin vermutlich nur geringfügig aus dem Scaffold, welches eine langanhaltende Freisetzung des Wachstumsfaktors begünstigt. In den Arbeiten von (Teixeira et al., 2010) wurde die Freisetzung von BMP-2 aus Kollagen-beschichteten Hydroxylapatit-Scaffolds durch die Modifizierung mit Heparin um 30% verzögert.

Die Freisetzungsrate von VEGF aus den Varianten HYA und MC verringerte sich tendenziell ähnlich der Kontrollvariante (ohne Depot) über einen längeren Zeitraum von 27 Tagen. Dieses Ergebnis kann durch den optischen Nachweis des Depots (für Hyaluronsäure) nach 28 Tagen bzw. bei der Anwendung des Fluoreszenz-markierten VEGF nach 7 Tagen bestätigt werden, bei der das Depot sich größtenteils aufgelöst hatte und vermutlich aus dem Scaffold herausdiffundiert war. Allerdings wurde die eingesetzte VEGF-Menge im Depot, im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Freisetzungsstudien mit Hydrogelen, nicht vollständig und nicht innerhalb der ersten Tage freigesetzt. Sehr wahrscheinlich bindet ein Teil des VEGF vor allem an der Mineralphase (HAP interagiert mit Wachstumsfaktoren (Dong et al., 2007)) des Materials und verzögert die Freisetzung. Durch die Verwendung von Heparin im VEGF-haltigen Depot (spezifische Bindung) wurde die Freisetzung von VEGF über 27 Tage relativ konstant verzögert. Dies könnte einen positiven Effekt auf Zellen *in vivo* haben, welche über einen längeren Zeitraum durch den freigesetzten Faktor stimuliert und vermutlich zur Migration ins Scaffold-Innere angeregt werden.

Die hier beschriebenen injizierbaren Komponenten zeigten am Beispiel des Wachstumsfaktors VEGF unterschiedliche Freisetzungskinetiken, von einer anfänglich relativ hohen bis zu einer konstanten und langanhaltenden Freisetzung und könnten daher in verschiedenen Bereichen erfolgreich als Drug Delivery-System zur Anwendung kommen.

Depot-Varianten der Gruppe 2

In der Gruppe 2 wurden die Hydrogelkomponente Alginat und Kombinationen von Alginat mit den Biopolymeren der Gruppe 1 als VEGF-haltiges Depot in das Scaffold injiziert.

Bei der Variante **Alg** wurde VEGF im Gegensatz zur **Kontrollvariante** verzögert und ab Tag 7 in höheren Konzentrationen freigesetzt. Durch die anfängliche Vernetzung der Alginatstruktur mit Ca^{2+} -Ionen wurde das Depot stabilisiert, welches auch im optischen Nachweis über 28 Tage erkennbar war und mittels einer intensiven Färbung durch FITC-VEGF im Depot/Zentrum des Scaffolds bestätigt werden konnte. In der Literatur finden sich teils widersprüchliche Freisetzungskinetiken aus dem Biopolymer Alginat.

In den Arbeiten von (Rabbany et al., 2010), mit durch Calciumchlorid vernetzten Alginatfilmen, kommt es zu einer hohen initialen Freisetzung von 60% des eingesetzten SDF-1 innerhalb von 72 h. Im Gegensatz dazu konnten Studien von (Downs et al., 1992) noch ca. 40% des eingesetzten bFGF in Alginatbeads nach 7 Tagen wiederfinden. Auch Versuche der Gruppe (Lee et al., 2003) erzielten eine kumulative Freisetzung von 60% VEGF nach 7 Tagen aus Alginatbeads. Eine konstante Freisetzung mit 5% VEGF/Tag wurde mit Alginatbeads in Studien von (Peters et al., 1998) erzielt. Eine noch stärkere Verzögerung der Freisetzung aus beladenen Alginatbeads auf nur 50% des eingesetzten VEGF nach 14 Tagen wurde in den Arbeiten von (Elcin et al., 2001) nachgewiesen.

Vermutlich gibt es eine spezifische Bindung oder elektrostatische Interaktionen von VEGF mit Alginat, wodurch die Freisetzung des Wirkstoffes verzögert wird. Allerdings konnte in der Gruppe von (Freeman et al., 2008) nur mit sulfatiertem Alginat eine spezifische Bindung mit VEGF gefunden werden. Aus sulfatierten Alginatbeads wurden hierbei 50% – im Gegensatz zu einer vollständigen Freisetzung aus reinen Alginatbeads – des eingesetzten VEGF nach 7 Tagen freigesetzt. Aufgrund der positiven Nettoladung von VEGF und der negativen Ladung von Alginat beschreibt die Studie von (Gu et al., 2004) elektrostatische Interaktionen zwischen Alginat und VEGF, welches zu einer verzögerten Freisetzung aus Alginatbeads führen kann. Allerdings zeigt diese Studie auch, dass die Interaktionen nur schwach sind und durch weitere Proteine aus dem Zellkulturserum die Freisetzung von VEGF erhöht wird. Auch die eingesetzte Calciumkonzentration, mit der die Beads vernetzt werden, hat eine Bedeutung für die Bindung von VEGF, so dass hohe Konzentrationen an Calcium (1 M) zu einer vollständigen Freisetzung von VEGF aus Alginatbeads nach 5 Tagen führten. Hingegen wurden bei der Verwendung von einer 0,2 M-Calciumchloridlösung nur 10% des eingesetzten VEGF nach 5 Tagen

freigesetzt. Diesbezüglich ist es aus der Literatur nicht ganz ersichtlich, wodurch die Freisetzung von VEGF aus einem Alginatdepot verzögert wird. Wie bereits beschrieben, war das Depot nach 28 Tagen noch nachweisbar. Demzufolge könnte auch eine physikalische Barriere durch die vernetzte Alginatstruktur die Freisetzungskinetik beeinflussen.

Depots mit **Hyaluronsäure** und **Methylcellulose in Kombination mit Alginat** wurden auch mit Ca^{2+} -Ionen vernetzt. Dadurch konnte zumindest optisch das Depot aus Alginat + Hyaluronsäure im Vergleich zu jenen aus nur Hyaluronsäure auch noch nach 27 Tagen nachgewiesen werden. Allerdings war die Färbung unspezifisch, so dass nicht eindeutig bestimmt werden konnte, ob nur Alginat, nur Hyaluronsäure oder eine Kombination aus den beiden detektiert wurde. Vermutlich besteht aber das Depot aus beiden Komponenten, da die Variante Hyaluronsäure nach 28 Tagen nicht und die Variante Alginat nur schwach nachgewiesen werden konnte. Die Variante Alg+MC konnte aufgrund der unspezifischen Färbung (Scaffold wurde größtenteils mit angefärbt) nicht detektiert werden.

Die VEGF-Freisetzung aus der Variante Alg + HYA war im Gegensatz zur Kontrollvariante initial niedriger und über den gesamten Zeitraum etwas verzögert. Vermutlich wurde das VEGF durch die Vernetzung der Alginatkomponente eingekapselt bzw. interagierte schwach mit Alginat (Gu et al., 2004). Allerdings scheint die Kombination mit Alginat keinen wesentlichen Einfluss auf die Freisetzung von VEGF zu haben. Die Freisetzungsprofile von den Varianten Alg, HYA und Alg + HYA sind besonders in der kumulativen Darstellung (Abbildung 40) sehr ähnlich. Vermutlich beruht die verzögerte VEGF-Freisetzung im Vergleich zur Kontrollvariante auf einem physikalischen Effekt der Depotkomponenten. In der Studie von (Bian et al., 2011) war der Unterschied in der Freisetzung von TGF- β 3 aus mit einem Nanofilm beschichteten Alginatbeads und mit den selben Beads eingekapselt in einem Hyaluronsäuregel (setzte 10% weniger frei) nur gering, welches das erhaltene Ergebnis mit den Depotvarianten bestätigt.

Auch die Kombination aus Alginat und Methylcellulose setzte initial weniger VEGF frei als die der Kontrollvariante, wobei die freigesetzte Gesamtmenge über den Zeitraum tendenziell geringer war, auch im Vergleich zu den Varianten Alg und Alg + HYA. Dies konnte auch in Wiederholungsversuchen bestätigt werden. Hierbei hat vermutlich die Handhabung bei der Injizierung der Kombinationen aus Alginat und Methylcellulose (auch Alginat + Hyaluronsäure) einen Einfluss. Im Gegensatz zu den einzelnen Komponenten, war die Kombination mit Alginat sehr viskos und damit schwieriger in das Scaffold aus mineralisiertem Kollagen zu injizieren. Hierbei kam es zu einem Unterdruck beim Einsaugen des Gels in die Pipette und einem Überdruck beim Injizieren in das Scaffold. Ein „Nachtropfen“ aus der Spitze konnte somit nicht verhindert werden, was die Genauigkeit der injizierten Menge beeinflusste. Allerdings könnte auch eine stärkere physikalische Barriere bei dieser Kombination im Vergleich zur Variante mit Alg + HYA die Freisetzung von VEGF nach 7 Tagen Kultivierungszeit verzögert haben. Durch den fehlenden Nachweis der

injizierten Komponenten ist es aber schwierig, eine Aussage zu treffen. Das Ergebnis konnte anhand einer Studie von (Nochos et al., 2008) nicht bestätigt werden. Hier wurde die Freisetzung des Modellproteins BSA (im Vergleich zu VEGF negativ geladen) aus Alginatbeads mit Hydroxypropyl-Methylcellulose, in verschiedenen Verhältnissen, getestet. Es zeigte sich, dass die Verwendung von Alginat mit Methylcellulose zu einer mit 40% erhöhten Freisetzung im Gegensatz zu reinen Alginatbeads mit 8% der eingesetzten Menge nach 7 h führte.

Die injizierte Variante **Alg + Hep** wies keine initial hohe Freisetzung im Gegensatz zur Kontrollvariante und den anderen Varianten der Gruppe 2 auf. Durch die spezifische Bindung an Heparin wurde VEGF konstant und über den Zeitraum langanhaltend freigesetzt. Bestätigung dafür war der starke optische Nachweis des Depots nach 28 Tagen. In Versuchen mit FITC-VEGF konnte außerdem ein intaktes Wirkstoffdepot im Zentrum des Scaffolds nach 7 Tagen detektiert werden. Es gibt zahlreiche Studien von Drug Delivery-Systemen, die auf Heparin in Hydrogelen basieren und die Ergebnisse einer langanhaltenden Freisetzung bestätigen. In den Arbeiten von (Peattie et al., 2008) konnte der Wachstumsfaktor VEGF mit Hilfe von Heparin in funktionalisierten Hyaluronsäuregelen kontinuierlich über 30 Tage freigesetzt werden. Auch Fibrinmatrices mit Heparin setzten den Faktor beta-NGF, im Vergleich zu Matrices ohne Heparin, im Zeitraum von 14 Tagen verlangsamt frei (Sakiyama-Elbert und Hubbell, 2000). In Studien von (Lee et al., 2004) zeigten durch Chitosan beschichtete Alginathydrogele mit Heparin eine kontinuierliche Freisetzung über 10 Tage, während Alginathydrogele, beschichtet mit Chitosan aber ohne Heparin, 90% des eingesetzten VEGF innerhalb von 5 Tagen freisetzten. Eine konstante und langanhaltende Freisetzung von VEGF wurde des Weiteren durch Heparin-enthaltende PEG-Gele (Tae et al., 2006), von bFGF aus funktionalisierten PEG-Gelen mit Heparin (Nie et al., 2007) und von BMP-2 aus Hyaluronsäure-basierenden Hydrogelpartikeln mit unterschiedlichen Heparinkonzentrationen (Xu et al., 2011) erreicht. Eine mögliche Freisetzung von Heparin bzw. Heparin/VEGF-Komplexen wurden in den Studien allerdings nicht untersucht.

Beim Vergleich der Biopolymere aus Gruppe 1 und 2 (mit Ausnahme von Heparin bzw. Alginat + Heparin) konnte festgestellt werden, dass die Freisetzungskinetik von VEGF, geprägt durch einen „initial burst“ mit anschließender Abnahme der freigesetzten Menge, ähnlich ist, wobei die freigesetzte VEGF-Menge etwas variiert. Dieses Ergebnis scheint durch unspezifische Bindungen bzw. schwache Interaktionen mit den Biopolymeren hervorgerufen zu werden. VEGF wird vermutlich durch eine physikalische Barriere der Depots und weitergehenden Interaktionen mit Kollagen und HAP, im Gegensatz zur Kontrollvariante, verzögert freigesetzt. Bei der Variante Hep (Gruppe 1) und Variante Alg + Hep (Gruppe 2) ist die Freisetzungskinetik (ohne „initial burst“ und konstant langanhaltend) nahezu identisch und unterscheidet sich damit von allen anderen injizierten Komponenten bzw. der Kontrollvariante. Die spezifische Bindung von VEGF an

Heparin verzögert hierbei stark die Freisetzung. Die Kombination aus Alginat und Heparin setzte kumulativ etwa 10% mehr VEGF im Vergleich zum Heparin-basierten Depot frei. Anscheinend wirkt Heparin allein lokaler (spezifischer auf eine geringe Fläche), da mehr Bindungsstellen für VEGF vorhanden sind.

In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung von unterschiedlichen Depot-Komponenten, welche in das Scaffold injiziert wurden, die Freisetzungskinetik von VEGF kontrolliert und modifiziert werden kann. Der Faktor konnte in verschiedenen Konzentrationsbereichen einerseits initial, danach verzögert oder andererseits ohne „initial burst“, dafür konstant und langanhaltend freigesetzt werden. In der Literatur ist nicht bekannt, ob eine anfänglich hohe Freisetzung einen positiven Effekt auf die Chemoattraktion von Zellen, keinen oder sogar einen negativen Effekt (z.B. auf die Bildung von Gefäßstrukturen) hat. Demzufolge wäre es sinnvoll, entsprechende Varianten (u.a. Depots aus Hyaluronsäure) *in vivo* zu testen und speziell einen möglichen Effekt in der Anfangsphase nach der Implantation zu untersuchen. Die Varianten Alginat + Hyaluronsäure, besonders aber Alginat + Methylcellulose, sind aufgrund ihres hochviskosen Charakters schwieriger zu injizieren und damit als Drug Delivery-System im Scaffold ungeeignet. Des Weiteren sind die Unterschiede in der Freisetzung von VEGF im Vergleich zu den einzelnen Komponenten (Alginat, Hyaluronsäure) eher gering. Das System aus mineralisiertem Kollagen und injiziertem VEGF in Kombination sowohl mit Heparin als auch in Kombination mit Alginat/Heparin scheint hinsichtlich einer konstanten und langanhaltenden Freisetzung ideal zu sein. Auch können bei der Ausbildung eines Wirkstoffgradienten (bei entsprechender Freisetzung) Zellen durch Chemotaxis in das Scaffold angelockt werden. Auf diesen Aspekt wird im Abschnitt 5.2.5 näher eingegangen. Im Bereich des *in situ*-Tissue Engineerings wird in der Literatur beschrieben, dass besonders eine konstante und langanhaltende Freisetzung die Bildung eines vaskulären Netzwerkes sowie die Anlockung von Zellen in ein Zell-freies Scaffold nach der Implantation fördert und damit eine Knochenheilung/-regeneration unterstützt.

5.2.4 Biologische Aktivität des freigesetzten VEGF

Die biologische Aktivität des freigesetzten VEGF aus injizierten Wirkstoffdepots wurde zum Zeitpunkt nach 7 Tagen und zu späteren Zeitpunkten (13 und 27 Tagen) anhand der Proliferationssteigerung von Endothelzellen getestet. Es konnte nachgewiesen werden, dass das freigesetzte VEGF sowohl aus den Depots mit unterschiedlichen Komponenten (mit und ohne Hydrogel), als auch für die Kontrollvariante (injiziertes VEGF ohne Depot), während der gesamten Versuchsdauer biologisch aktiv war.

Im Vergleich zur Kontrollvariante war das freigesetzte VEGF aus den verschiedenen Depotvarianten biologisch aktiver und führte teilweise zu einer 4- bis 6-fachen Steigerung der Zellzahlzunahme. Im Besonderen war dieser Effekt nach 7 und 14 Tagen zu sehen. Vermutlich korreliert

die freigesetzte VEGF-Menge mit der Proliferation der Zellen, welches im Abschnitt 4.1.5 durch eine VEGF-Kalibriergerade bestätigt werden konnte. Hierbei wurde aus den Depotvarianten überwiegend mehr VEGF freigesetzt als bei der Kontrollvariante. Auch wurde nach 4 Wochen mehr VEGF aus den Depotvarianten im Vergleich zur Kontrollvariante freigesetzt. Allerdings führte dies nur zu einer geringfügigen Zunahme der Zellzahl und es lässt sich vorsichtig schlussfolgern, dass das freigesetzte VEGF nicht mehr so biologisch aktiv war als noch nach 7 Tagen. Vermutlich nahm die biologische Aktivität aufgrund der geringen Halbwertszeit des Wachstumsfaktors ab (Shima et al., 1995; Simón-Yarza et al., 2012).

Interessanterweise wiesen die Depotvariante mit Heparin und die Kombination mit dem Hydrogel Alginat und Heparin auch nach 4 Wochen eine hohe biologische Aktivität des freigesetzten VEGF auf, was auf die spezifische Bindung mit Heparin und die daraus resultierenden Vorteile, wie dem Schutz vor Degradation und Denaturierung als auch eine mögliche Steigerung der biologischen Aktivität durch Konformationsänderungen der VEGF-Struktur, zurückzuführen ist.

In der Literatur wird in vielen Studien die Wirksamkeit von freigesetzten Faktoren aus Hydrogelen beschrieben. So konnte (Peattie et al., 2004) das Einwachsen von Blutgefäßen *in vivo* in ein Hyaluronsäuregel, beladen mit VEGF, nachweisen. Die Bildung von Knorpelgewebe *in vivo* wurde durch die Freisetzung von TGF- β 3 aus Alginatmikrosphären in einem Hyaluronsäuregel erzielt (Bian et al., 2011). Aber auch das System aus einem mit Alginat-beschichteten Titanscaffold, welches den Faktor Simvastatin freisetzte, bewirkte eine Unterstützung der osteogenen Differenzierung von MSC *in vitro* (Pullisaar et al., 2014).

Auch in Kombination mit Hydrogelen hat Heparin einen positiven Effekt auf die biologische Aktivität des freigesetzten Faktors. Sulfatiertes Alginathydrogel, an dem der Wachstumsfaktor FGF binden konnte, zeigte eine konstante Freisetzung und die Ausbildung von doppelt so vielen Blutgefäßen, im Vergleich zum direkt dazugegebenen Wachstumsfaktor (Freeman et al., 2008). In der Studie von (Ohta et al., 2004) beschleunigten Alginatgele mit Heparin und dem Faktor FGF das Wachstum von Nervenaxonen und wiesen eine bessere Vaskularisierung auf, als FGF-beladene Alginatgele ohne Heparin. Eine Verlängerung von Neuriten konnte durch den Einsatz von Fibringelen mit Heparin und den Faktor β -NFG erreicht werden, während dies bei reinen Fibringelen nicht auftrat (Sakiyama-Elbert und Hubbell, 2000).

In dieser Arbeit konnte erfolgreich nachgewiesen werden, dass Heparin als Depotkomponente bzw. in Kombination mit Alginat einen positiven Effekt auf die metabolische Aktivität von Endothelzellen auch nach längerer Kultivierungszeit von 28 Tagen hatte. Im Vergleich zu Heparin stabilisierten aber auch die Depotvarianten aus Alginat, Hyaluronsäure oder Methylcellulose ohne Heparin die Wirksamkeit des freigesetzten VEGF, wenn auch um einiges schwächer.

5.2.5 Migration in Richtung eines VEGF-haltigen Depots

Es wurde zudem untersucht, ob Endothelzellen in Richtung des injizierten VEGF-haltigen Depots durch den Prozess der Chemoattraktion migrieren.

Für die Varianten ohne Depot (mit 200 und 400 ng VEGF) und mit Depot (1% Alginat mit 100 ng VEGF) konnte im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (ohne VEGF) eine gesteigerte Migration nachgewiesen werden, wobei die Zellen bis in eine Tiefe von 1000 µm ins Scaffold wanderten. Allerdings ist das System aus den Komponenten Scaffold (Kollagen + Mineral), injiziertes Depot (verschiedene Komponenten) und Wachstumsfaktor für eine Migration von Zellen in das Scaffold sehr komplex und auch weitere Parameter (u.a. Versuchsdauer, Zelltyp, Kulturmedium, Ausbildung eines Wirkstoffgradienten, geeigneter Konzentrationsgradient) können einen wesentlichen Einfluss auf das Ergebnis haben. Dies führte trotz Anwendung zuvor getesteter Zellkulturbedingungen (dreitägige Inkubation, Basalmedium, HDMEC) zu unterschiedlichen Ergebnissen; von einer fehlenden Migration (Zellen befanden sich größtenteils in einer Tiefe bis 200 µm) bis zu einer starken Chemokinese (zufällige Migration) auch bei der Kontrollgruppe ohne VEGF. Damit wurde die Reproduzierbarkeit des Nachweises eines chemoattraktiven Effektes auf die Zellen durch ein injiziertes VEGF-haltiges Depot erschwert. Scheinbar sind die Ausbildung eines Wirkstoffgradienten und der Konzentrationsbereich des ausgebildeten Wirkstoffgradienten *in vitro* von entscheidender Bedeutung, damit die eingesetzten Zellen angelockt werden, welches auch in der Literatur (Chung et al., 2009; Chen et al., 2011; Odedra et al., 2011; Vanden Berg-Foels, 2014) beschrieben wurde. Weiterhin ist zu vermuten, dass eine Zellmigration im Gegensatz zur Migration in Zellkulturgefäßen und in Hydrogelsystemen im Scaffold durch das interkonnektierende Porensystem erschwert wird, da dessen Struktur von Scaffold zu Scaffold ähnlich aber nicht identisch ist.

In den Arbeiten von (Gerhardt, 2003) wurde in Mäusen nachgewiesen, dass ein bestimmtes Verhältnis eines VEGF-Gradienten und der Konzentration notwendig ist, so dass Endothelzellen migrierten. Hierbei scheinen die Zellfortsätze (Filopodien) eine wichtige Bedeutung zu haben, mit denen die Zellen besonders auf Einflüsse der Mikroumgebung auf eine gerichtete Migration reagieren (Bär und Wolff, 1972; Marin-Padilla, 1985). Die Arbeiten von (Odedra et al., 2011) beschreiben die Migration von Endothelzellen in Richtung eines im Kollagenscaffold mit EDC immobilisierten VEGF-Konzentrationsgradienten von 2 ng/ml/mm. Mit Hilfe eines mikrofluiden Kanals konnten Endothelzellen durch Chemotaxis *in vitro* angelockt werden, bei denen sich ein Gradient von 0-20 ng VEGF/ml (Chung et al., 2009), 18-32 ng VEGF/ml (Shamloo et al., 2008) und 0-50 ng VEGF/ml (Barkefors et al., 2008) als effektiv erwies. Eine Konzentrationsabhängige Migration konnte auch mit Osteoblastenzellen mit Hilfe einer Boyden-Kammer (Zellen müssen aktiv durch eine mikroporöse Membran migrieren) *in vitro* nachgewiesen werden, bei dem der größte chemoattraktive Effekt bei 10 ng VEGF/ml (von 0,1, 1,0 und 10 ng

VEGF/ml) gemessen wurde. Hierbei bewirkte auch PlGF-1, ein weiterer Faktor der VEGF-Familie, eine gerichtete Migration der Zellen (Mayr-Wohlfart et al., 2002).

Ein großer Vorteil des hier beschriebenen Drug Delivery-Systems aus Scaffolds mit injiziertem Depot ist die Variabilität des Wachstumsfaktors. In der Arbeit wurde der Modellfaktor VEGF-A₁₆₅ verwendet, aber es können auch andere Heparin-bindende Faktoren in einem zu injizierenden Heparin-Depot oder eine Kombination aus verschiedenen Wachstumsfaktoren wie VEGF (zur Unterstützung der Blutgefäßbildung und Anlockung von Zellen) und BMP (zur Bildung von Knochengewebe) in einem Hydrogeldepot angewandt werden. In den Arbeiten von (Gabrielyan et al., 2014) wurde eine gesteigerte Migration von MSC durch Hypoxie-konditioniertes Medium, welches sich aus einer Vielzahl von Faktoren (z.Bsp. VEGF) zusammensetzt, im Vergleich zu Medium ohne VEGF und teilweise sogar mit VEGF (200 ng/ml) beschrieben. Somit könnten verschiedene Chemokine (wie SDF-1 α oder VEGF-A₁₆₅) in einem injizierten Depot in Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen zu einer effektiveren Migration führen.

Es gibt sehr viele Trägersysteme für Wachstumsfaktoren und Chemokine, welche ihre Wirksamkeit in *in vitro*- als auch *in vivo*-Versuchen demonstrierten. Je nach Beschaffenheit der Gele oder Scaffolds, Art des Wachstumsfaktors und dessen Freisetzungskinetik werden unterschiedliche Zellreaktionen (Wachstum, Differenzierung und Migration) beeinflusst, die das Anwendungsgebiet des jeweiligen Systems (z.B. Angiogenese oder Knochenbildung) bestimmen. Das System mit Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen und injizierbarem Wirkstoffdepot eröffnet die Möglichkeit für eine beschleunigte Defektheilung im Knochen.

Zusammenfassung

Beim Tissue Engineering ist die Vaskularisierung von größeren Zell-Matrix-Konstrukten nach Implantation bis heute ein großes Problem. Durch das initiale Fehlen eines mikrovaskulären Netzwerkes kommt es zu einem raschen Zellsterben im Scaffold. Aufgrund dessen war das Ziel dieser Arbeit, im Sinne des *in situ*-Tissue Engineering ein Scaffold auf Basis von mineralisiertem Kollagen zu entwickeln, welches mit dem angiogenen Wachstumsfaktor VEGF funktionalisiert wird, um den Prozess der Vaskularisierung – die Einsprossung von Blutgefäßen – zu fördern und gleichzeitig durch Chemoattraktion *in vivo* Zellen aus dem umliegenden Knochengewebe in das Innere des Scaffolds migrieren zu lassen, so dass eine beschleunigte Defektheilung erzielt wird.

Poröse Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen wurden durch zwei unterschiedliche Strategien funktionalisiert und durch *in vitro*-Testungen charakterisiert. Die erste Strategie umfasste die Heparin-Modifizierung der gesamten Scaffolds, während die zweite Strategie die Injizierung eines zentralen VEGF-haltigen Depots in das Scaffoldinnere darstellte.

Heparin-Modifizierung der Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen

Die Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen wurden mittels zweier verschiedener Ansätze komplett mit Heparin modifiziert. Bei der „insitu“-Modifizierung wurde Heparin vor dem Prozess der parallel ablaufenden Kollagenfibrillenbildung und Mineralisation zugegeben, so dass sich das Heparin in die Struktur einlagern konnte. Im Gegensatz dazu wurde bei der „post“-Modifizierung Heparin nachträglich an fertige Scaffolds gebunden.

Bei beiden Ansätzen zeigte sich mit Hilfe der DMMB-Methode, dass ein Großteil des eingesetzten Heparins am Scaffold gebunden hatte und homogen verteilt war. Hierbei konnte mehr Heparin bei der „post“- (fast 100%) als bei der „insitu“-Modifizierung (50-70%) wiedergefunden werden. Auch eine Inkubation der modifizierten Trägermaterialien unter Zellkulturbedingungen über 28 Tage konnte die relativ starke Bindung des Heparins am Material belegen, wobei im Durchschnitt 70% des eingesetzten Heparins bei den „post“-Varianten und 60% bei den „insitu“-Varianten nach 28 Tagen noch nachgewiesen wurde. Durch den Einbau von Heparin in das Nanokompositmaterial aus Kollagen und Hydroxylapatit bei der „insitu“-Modifizierung wurden die Materialien im Vergleich zur Heparin-freien Variante und der „post“-Modifizierung steifer und fester. Im REM wurde gezeigt, dass Heparin keinen Einfluss auf die Morphologie der Scaffolds (Porenstruktur und Porendurchmesser mit 80-150 µm waren annähernd gleich) zu haben scheint. Die HAP-Kristallbildung, analysiert mit Hilfe von TEM, schien bei der untersuchten „insitu“-Variante durch die Gegenwart von Heparin nicht beeinflusst zu werden. Auch die Zusammensetzung der Scaffolds, ermittelt über den Glühverlust, bei der „insitu“- und „post“-Modifizierung sehr ähnlich.

In Zellkulturversuchen mit hMSC konnte ein positiver Einfluss der Heparin-Modifizierung („insitu“ und „post“), durch eine gesteigerte Adhäsion und Proliferation der Zellen an den Scaffolds im Vergleich zur Heparin-freien Variante gefunden werden. Über den Kultivierungszeitraum waren die Zellen in der Lage, in die poröse Scaffoldstruktur zu migrieren, diese vollständig zu besiedeln und, dargestellt durch die LDH-Aktivität, metabolisch aktiv zu bleiben. Die Zellen auf den modifizierten Scaffolds zeigten zudem eine stärkere osteogene Differenzierung, gezeigt anhand der höheren ALP-Aktivität.

Ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit war die Freisetzung des Wachstumsfaktors VEGF aus den modifizierten Scaffolds, welches mittels ELISA untersucht wurde. Durch die spezifische Bindung von VEGF an Heparin wurde der Wachstumsfaktor, im Gegensatz zur Heparin-freien Variante, konstant und verzögert über einen längeren Zeitraum von 28 Tagen freigesetzt. Die „insitu“-modifizierten Scaffolds setzten dabei tendenziell etwas mehr VEGF frei als die „post“-modifizierten Scaffolds. Bei niedrigeren Heparinkonzentrationen war die VEGF-Freisetzung etwas erhöht, wodurch sich die Möglichkeit ergab, die Freisetzungskinetik über den Heparingehalt einzustellen.

Zusätzlich zur Quantifizierung der freigesetzten Menge an VEGF wurde dessen biologische Aktivität anhand eines Proliferationsassays bestimmt. Das zu einem sehr frühen (nach 24 h) und zu einem späteren (nach 7 d) Zeitpunkt freigesetzte VEGF aus Heparin-freien und Heparin-modifizierten Varianten stimulierte die Proliferation der Endothelzellen. Besonders bei den „insitu“-Varianten steigerte das nach 7 Tagen freigesetzte VEGF, im Vergleich zu VEGF von Heparin-freien Varianten, die Zellzahl, was auf einen stabilisierenden und wirksamkeitssteigernden Effekt des VEGF durch die Heparinbindung hindeutet. Zusätzlich wurde die mitogene Wirkung von freigesetztem VEGF mit frischem VEGF verglichen und auch hier zeigte sich bei den „insitu“-modifizierten Scaffoldvarianten ein stärkerer proliferationsstimulierender Effekt auf die Zellen.

Scaffolds mit einem injizierten VEGF-haltigen Depot

Für die Funktionalisierung der Scaffolds mit einem zentral injizierten VEGF-haltigen Depot wurden als Depot-Komponenten neben dem Wachstumsfaktor-bindenden Polysaccharid Heparin auch viskose Gele wie Hyaluronsäure und Methylcellulose und Hydrogele aus Alginat verwendet. Zusätzlich wurden Kombinationen aus Alginat + Heparin, Alginat + Hyaluronsäure und Alginat + Methylcellulose eingesetzt.

Mit Hilfe verschiedener Färbereagenzien konnte das zentrale Depot der Varianten mit Heparin und Alginat + Heparin im Gegensatz zu den restlichen Varianten auch nach längerer Inkubationszeit (4 Wochen) deutlich nachgewiesen werden, was auf die starke Bindung des Heparins an die Scaffoldkomponenten Kollagen und Hydroxylapatit zurückzuführen ist. Unter Verwen-

derung von Fluoreszenz-markiertem VEGF konnte zum einen das injizierte Depot im Scaffold sichtbar gemacht und zum anderen die Ausbildung eines Wirkstoffgradienten untersucht werden. Dabei zeigte sich eine rasche Konzentrationsabnahme des injizierten Faktors an der Depotstelle für die Kontrollvariante (nur VEGF ohne weitere Depotkomponenten) nach 24 h. Die Ausbildung eines Wirkstoffgradienten, bei dem ein Konzentrationsgefälle im Scaffold entstand (hohe Konzentration im Depot, wenig VEGF im restlichen Scaffold), wurde für die getesteten Varianten mit Hyaluronsäure und Methylcellulose nachgewiesen. Nach mehr als 3 Tagen war das injizierte VEGF nicht mehr zu erkennen, was dafür spricht, dass ein Großteil der Depotkomponenten mit dem VEGF bereits in das restliche Scaffold bzw. aus dem Scaffold herausdiffundiert war. Bei den Varianten Alginate und Alginate + Heparin war das Depot auch nach 7-tägiger Inkubation noch stabil und die Ausbildung eines Wirkstoffgradienten war in diesem Zeitraum deutlich zu erkennen. Aus den Freisetzungsforschungen lässt sich schließen, dass das Depot auch noch zu späteren Zeitpunkten (28 Tage) stabil war.

Mit Hilfe der unterschiedlichen Depotkomponenten konnte die VEGF-Freisetzungsforschung modifiziert werden. Die Varianten Heparin und Alginate + Heparin zeigten hierbei eine konstante und langanhaltende Freisetzung über 28 Tage. Andere Depotkomponenten, u.a. Alginate oder Hyaluronsäure, setzten den injizierten Wirkstoff schneller frei und wiesen eine unterschiedlich hohe initiale Freisetzung auf. Es konnte außerdem anhand des stimulierenden Effektes von VEGF in einem Proliferationsassay mit Endothelzellen nachgewiesen werden, dass auch das nach 4 Wochen freigesetzte VEGF noch biologisch aktiv war. In einem Migrationsversuch konnte zudem gezeigt werden, dass Endothelzellen gegenüber der Kontrollvariante ohne VEGF deutlich weiter in die Richtung eines Wirkstoffgradienten in das Scaffoldinnere mit VEGF bzw. VEGF-haltigem Depot migriert sind.

Aus den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die entwickelten Strategien der Heparinmodifizierung („insitu“ und „post“) des gesamten Scaffolds bzw. der zentralen Injizierung eines VEGF-haltigen Depots das Ziel einer verzögerten und langanhaltenden Wirkstofffreisetzung und sogar das der gerichteten Chemoattraktion von Zellen erfüllten. Durch die Verwendung von verschiedenen Heparinkonzentrationen bzw. unterschiedlichen Depotkomponenten konnte die Freisetzungsforschung des hier verwendeten angiogenen Faktors VEGF gesteuert werden, was sich in nächsten Schritten auch auf andere Wachstumsfaktoren übertragen lassen sollte. Die funktionalisierten Trägermaterialien sind soweit erforscht, dass sie nun auch *in vivo* in Tierversuchen getestet werden können, um in Hinblick auf eine schnellere Vaskularisierung des Materials und Chemoattraktion von Zellen eine verbesserte Regeneration von Knochendefekten zu erzielen.

Summary

Tissue Engineering is a promising field, however, one of the major drawbacks that persist till this date is the inadequate vascularization of big cell-matrix constructs after implantation. The lack of an initial vasculature network leads to rapid cell death within the scaffold. Aim of this thesis was to develop a scaffold based on mineralized collagen for *in situ* tissue engineering. This scaffold has to be functionalized with the angiogenic factor VEGF to promote the process of vascularization (ingrowth of new blood vessels) and simultaneously attract *in vivo* cells with regenerative potential from surrounding bone tissue into the scaffold to enhance the healing of the defect *in vivo*.

Two different strategies were used for functionalization and *in vitro* characterization of highly porous mineralized collagen scaffolds. The first strategy was to modify the whole scaffolds with heparin whereas an injection of a central VEGF-containing depot into the scaffold represents the second strategy.

Heparin-modification of scaffolds of mineralized collagen

Entire scaffolds of mineralized collagen were completely modified with heparin via two different approaches. The “insitu” modification describes the addition of heparin before alignment of collagen fibers and mineralization, resulting in intercalation of heparin into the structure. In contrast, the “post” modification comprised assembly of collagen scaffolds with subsequent addition and binding of heparin.

By means of the DMMB method binding and homogenous distribution of bound heparin to the scaffolds could be shown for both modification approaches. Almost all heparin (nearly 100%) could be recovered from “post” and 50-70% of the heparin from “insitu” modified scaffolds. The relatively strong binding of heparin to the scaffold could also be observed after incubation of the scaffolds over 28 days, whereupon on average 70% of the bound heparin was retrieved from “post” and 60% from “insitu” modified scaffolds. The mechanical stiffness of the material was increased through the intercalation of heparin into the nanocomposite material of “insitu” variants in comparison to the “post” variants. SEM analyses showed that heparin did not seem to have an effect on the morphology of the material as measured by pore structure and pore diameter (80-150 μm) which were similar for all scaffold variants. Also crystallization of HAP, analyzed by TEM, was not influenced by presence of heparin for the tested “insitu” modification. The composition of the scaffold was measured by loss of ignition which exhibited that the amount of organic and inorganic phase of the modified scaffolds (“insitu” and “post”) was comparable.

Cell culture experiments revealed positive effects of the heparin modification with enhanced adhesion and proliferation of the cells on modified scaffolds (“insitu” and “post”) compared to the

Heparin-free variant. The cells were able to migrate into the porous structure, fully colonize the scaffolds and stay metabolically active, which was observed by measuring the LDH activity, over the cultivation period. Furthermore, heparin modification increased the osteogenic differentiation of hMSC, analyzed by ALP activity.

An important part of the present work was the investigation of VEGF release from modified scaffolds, which was analyzed by ELISA. In consequence of the specific binding of VEGF to heparin, the release rate of the growth factor was constant and sustained over a longer time period of 28 days compared to heparin-free variants. The “insitu” modified scaffolds tended to release slightly more VEGF than the “post” modified scaffolds. Low concentrations of heparin increased the amount of free VEGF, which provided the possibility to regulate the release via the amount of heparin bound to the scaffold.

In addition to quantification of the released amount of VEGF, its biological activity was determined through a proliferation assay. It was shown that the VEGF released at an early (after 24 h) and later (after 7 d) time point from modified and from heparin-free scaffolds stimulated the proliferation of endothelial cells. Especially, VEGF released from “insitu” variants after 7 days could slightly enhance the cell number in contrast to VEGF released from heparin-free scaffolds, which indicates the specific binding of heparin stabilizes and increases the potency of VEGF. Furthermore, the mitogenic activity of released VEGF was compared to fresh VEGF and effect on proliferation was higher for that from “insitu” modified variants.

Scaffolds with an injected VEGF-containing depot

Components used for functionalization of the scaffolds with a central injected VEGF-containing depot, were the growth factor binding molecule heparin, but also viscous gels like hyaluronic acid or methyl cellulose and hydrogels consisting of alginate. Also combinations with the alginate-hydrogel (alginate + heparin, alginate + hyaluronic acid and alginate + methyl cellulose) were applied as a depot.

In contrast to other variants the central depots of the variants with heparin and alginate + heparin could be clearly detected after a long incubation time (4 weeks) of the functionalized scaffolds, which was shown through different dyes. This result can be attributed to the strong interaction of heparin with the scaffold components. The injected depots could also be localized and the formation of a gradient could be shown with the help of fluorescently labeled VEGF. Thereby, a rapid reduction of the injected amount of VEGF was demonstrated for the control (only VEGF without depot components) after 24 h. For the tested variants with hyaluronic acid or methyl cellulose a gradient that had been established within the scaffold (high concentration in the central depot, low amount of VEGF in the outer parts of the scaffold) could be observed. Neither the injected VEGF nor the depot itself could be detected in the center after more than

3 days, however, which indicates that the VEGF as well as a large amount of the other components diffused into the outer parts of or out of the scaffold. For the variants with alginate and alginate + heparin a stable depot and a distinct formation of a gradient was detectable after an incubation of 7 days. On the basis of release experiments it can be concluded that the drug depot would also be stable at later time points of 28 days.

By providing different components for a depot it was possible to modify the release rate of VEGF. The variants with heparin and alginate + heparin showed a constant and sustained release over 28 days. Other components for the depot, for example alginate or hyaluronic acid, exhibited a faster release and had a different high initial burst of the injected VEGF. In addition, the proliferative effect of released VEGF even after 4 weeks was shown by a proliferation assay. Endothelial cells migrated deeper towards VEGF or VEGF containing depot within the scaffolds compared to the control without VEGF which was demonstrated by a migration test.

The results obtained in this thesis showed that the developed strategies – the heparin modification of whole scaffolds (“insitu” and “post”) as well as the injection of a central VEGF containing depot into the scaffolds – were successful to achieve a retarded and sustained drug release and attract cells by chemotaxis. The release rate of the angiogenic factor VEGF could furthermore be controlled by changing the concentration of heparin or using different components for the depot, which could also be transferred to other growth factors in next steps. The functionalized scaffold materials are widely established *in vitro*, so that they can be tested in animal experiments *in vivo* to promote an enhanced vascularization of the material and the chemoattraction of cells to improve the regeneration of bone defects.

Literaturverzeichnis

Aizawa Y, Wylie R, Shoichet M. 2010. Endothelial Cell Guidance in 3D Patterned Scaffolds. *Adv. Mater.* 22: 4831–4835.

Alvarez-Lorenzo C, Blanco-Fernandez B, Puga AM, Concheiro A. 2013. Crosslinked ionic polysaccharides for stimuli-sensitive drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65: 1148–1171.

Angelo I d', Oliviero O, Ungaro F, Quaglia F, Netti PA. 2013. Engineering strategies to control vascular endothelial growth factor stability and levels in a collagen matrix for angiogenesis: The role of heparin sodium salt and the PLGA-based microsphere approach. *Acta Biomater.* 9: 7389–7398.

Ashikari-Hada S, Habuchi H, Kariya Y, Kimata K. 2005. Heparin Regulates Vascular Endothelial Growth Factor165-dependent Mitogenic Activity, Tube Formation, and Its Receptor Phosphorylation of Human Endothelial Cells: COMPARISON OF THE EFFECTS OF HEPARIN AND MODIFIED HEPARINS. *J. Biol. Chem.* 280: 31508–31515.

Balasubramanian V, Onaca O, Enea R, Hughes DW, Palivan CG. 2010. Protein delivery: from conventional drug delivery carriers to polymeric nanoreactors. *Expert Opin. Drug Deliv.* 7: 63–78.

Barbosa I. 2003. Improved and simple micro assay for sulfated glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies. *Glycobiology* 13: 647–653.

Barkefors I, Jan S Le, Jakobsson L, Hejll E, Carlson G, Johansson H, Jarvius J, Park JW, Jeon N Li, Kreuger J. 2008. Endothelial Cell Migration in Stable Gradients of Vascular Endothelial Growth Factor A and Fibroblast Growth Factor 2: EFFECTS ON CHEMOTAXIS AND CHEMOKINESIS. *J. Biol. Chem.* 283: 13905–13912.

Barnes B, Boden SD, Louis-Ugbo J, Tomak PR, Park J-S, Park M-S, Minamide A. 2005. Lower dose of rhBMP-2 achieves spine fusion when combined with an osteoconductive bulking agent in non-human primates. *Spine* 30: 1127–1133.

Barr T, McNamara AJA, Sándor GKB, Clokie CML, Peel SAF. 2010. Comparison of the osteoinductivity of bioimplants containing recombinant human bone morphogenetic proteins 2 (Infuse) and 7 (OP-1). *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontology* 109: 531–540.

Bär TH, Wolff JR. 1972. The formation of capillary basement membranes during internal vascularization of the rat's cerebral cortex. *Z. Für Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 133: 231–248.

Baud'huin M, Ruiz-Velasco C, Jegou G, Charrier C, Gasiunas N, Gallagher J, Maillason M, Naggi A, Padrines M, Redini F, Duplomb L, Heymann D. 2011. Glycosaminoglycans inhibit the adherence and the spreading of osteoclasts and their precursors: Role in osteoclastogenesis and bone resorption. *Eur. J. Cell Biol.* 90: 49–57.

Bellido T. 2014. Osteocyte-Driven Bone Remodeling. *Calcif. Tissue Int.* 94: 25–34.

Beniash E. 2011. Biomaterials-hierarchical nanocomposites: the example of bone. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 3: 47–69.

Benoit DSW, Anseth KS. 2005. Heparin functionalized PEG gels that modulate protein adsorption for hMSC adhesion and differentiation. *Acta Biomater.* 1: 461–470.

Benoit DSW, Durney AR, Anseth KS. 2007. The effect of heparin-functionalized PEG hydrogels on three-dimensional human mesenchymal stem cell osteogenic differentiation. *Biomaterials* 28: 66–77.

Berleau LT. 1996. The Carboxyl-terminal Domain(111-165) of Vascular Endothelial Growth Factor Is Critical for Its Mitogenic Potency. *J. Biol. Chem.* 271: 7788–7795.

Bernhardt A, Despang F, Lode A, Demmler A, Hanke T, Gelinsky M. 2009a. Proliferation and osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on alginate-gelatin-hydroxyapatite scaffolds with anisotropic pore structure. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 3: 54–62.

Bernhardt A, Lode A, Boxberger S, Pompe W, Gelinsky M. 2007. Mineralised collagen – an artificial, extracellular bone matrix – improves osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 19: 269–275.

Bernhardt A, Lode A, Mitrach C, Hempel U, Hanke T, Gelinsky M. 2009b. *In vitro* osteogenic potential of human bone marrow stromal cells cultivated in porous scaffolds from mineralized collagen. *J. Biomed. Mater. Res. A* 90A: 852–862.

Berridge MV, Tan AS. 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* 303: 474–482.

- Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML. 2011. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 2: 403–430.
- Bian L, Zhai DY, Tous E, Rai R, Mauck RL, Burdick JA. 2011. Enhanced MSC chondrogenesis following delivery of TGF- β 3 from alginate microspheres within hyaluronic acid hydrogels in vitro and in vivo. *Biomaterials* 32: 6425–6434.
- Bidarra SJ, Barrias CC, Granja PL. 2014. Injectable alginate hydrogels for cell delivery in tissue engineering. *Acta Biomater.* 10: 1646–1662.
- Biondi M, Ungaro F, Quaglia F, Netti PA. 2008. Controlled drug delivery in tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60: 229–242.
- Blitterswijk van C. 2008. Tissue Engineering. London : Academic Press.
- Boix T, Gómez-Morales J, Torrent-Burgués J, Monfort A, Puigdomènech P, Rodríguez-Clemente R. 2005. Adsorption of recombinant human bone morphogenetic protein rhBMP-2m onto hydroxyapatite. *J. Inorg. Biochem.* 99: 1043–1050.
- Borenstein JT, Weinberg EJ, Orrick BK, Sundback C, Kaazempur-Mofrad MR, Vacanti JP. 2007. Microfabrication of three-dimensional engineered scaffolds. *Tissue Eng.* 13: 1837–1844.
- Boskey AL, Dick BL. 1991. Hyaluronan interactions with hydroxyapatite do not alter in vitro hydroxyapatite crystal proliferation and growth. *Matrix Stuttg. Ger.* 11: 442–446.
- Bradt J-H, Mertig M, Teresiak A, Pompe W. 1999. Biomimetic Mineralization of Collagen by Combined Fibril Assembly and Calcium Phosphate Formation. *Chem. Mater.* 11: 2694–2701.
- Breier G. 2000. Functions of the VEGF/VEGF receptor system in the vascular system. *Semin. Thromb. Hemost.* 26: 553–559.
- Brouwer KM, Wijnen RM, Reijnen D, Hafmans TG, Daamen WF, Kuppevelt TH van. 2013. Heparinized collagen scaffolds with and without growth factors for the repair of diaphragmatic hernia: Construction and in vivo evaluation. *Organogenesis* 9: 161–167.
- Buck DW, Dumanian GA. 2012. Bone Biology and Physiology: Part I. The Fundamentals. *Plast. Reconstr. Surg.* 129: 1314–1320.
- Buehler MJ. 2006. Nature designs tough collagen: explaining the nanostructure of collagen fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 12285–12290.

- Burth R, Gelinsky M, Pompe W. 1999. Collagen-hydroxyapatite tapes - a new implant material. *Tech Text.* 8 20.
- Caetano-Lopes J, Canhão H, Fonseca JE. 2009. Osteoimmunology — The hidden immune regulation of bone. *Autoimmun. Rev.* 8: 250–255.
- Caldwell EE, Nadkarni VD, Fromm JR, Linhardt RJ, Weiler JM. 1996. Importance of specific amino acids in protein binding sites for heparin and heparan sulfate. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28: 203–216.
- Capila I, Linhardt RJ. 2002. Heparin–protein interactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* 41: 390–412.
- Carano RA, Filvaroff EH. 2003. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov. Today* 8: 980–989.
- Cen L, Liu W, Cui L, Zhang W, Cao Y. 2008. Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications. *Pediatr. Res.* 63: 492–496.
- Charles JF, Aliprantis AO. 2014. Osteoclasts: more than ‘bone eaters’. *Trends Mol. Med.* 20: 449–459.
- Chen F-M, Wu L-A, Zhang M, Zhang R, Sun H-H. 2011. Homing of endogenous stem/progenitor cells for in situ tissue regeneration: Promises, strategies, and translational perspectives. *Biomaterials* 32: 3189–3209.
- Chen F-M, Zhang M, Wu Z-F. 2010a. Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering. *Biomaterials* 31: 6279–6308.
- Chen TT, Luque A, Lee S, Anderson SM, Segura T, Iruela-Arispe ML. 2010b. Anchorage of VEGF to the extracellular matrix conveys differential signaling responses to endothelial cells. *J. Cell Biol.* 188: 595–609.
- Chevallay B, Herbage D. 2000. Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy. *Med. Biol. Eng. Comput.* 38: 211–218.
- Chung HJ, Kim HK, Yoon JJ, Park TG. 2006. Heparin Immobilized Porous PLGA Microspheres for Angiogenic Growth Factor Delivery. *Pharm. Res.* 23: 1835–1841.
- Chung S, Sudo R, Mack PJ, Wan C-R, Vickerman V, Kamm RD. 2009. Cell migration into scaffolds under co-culture conditions in a microfluidic platform. *Lab. Chip* 9: 269.

- Chwalek K, Tsurkan MV, Freudenberg U, Werner C. 2014. Glycosaminoglycan-based hydrogels to modulate heterocellular communication in in vitro angiogenesis models. *Sci. Rep.* 4: 4414.
- Clarke B. 2008. Normal bone anatomy and physiology. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 3 Suppl 3: S131–139.
- Clarkin CE, Gerstenfeld LC. 2013. VEGF and bone cell signalling: an essential vessel for communication?: VEGF AND BONE CELL SIGNALLING. *Cell Biochem. Funct.* 31: 1–11.
- Clokie CM, Moghadam H, Jackson MT, Sandor GK. 2002. Closure of critical sized defects with allogenic and alloplastic bone substitutes. *J. Craniofac. Surg.* 13: 111–121.
- Compton JT, Lee FY. 2014. A Review of Osteocyte Function and the Emerging Importance of Sclerostin. *J. Bone Jt. Surg.* 96: 1659–1668.
- Cool SM, Nurcombe V. 2005. The osteoblast-heparan sulfate axis: Control of the bone cell lineage. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37: 1739–1745.
- Cui FZ, Li Y, Ge J. 2007. Self-assembly of mineralized collagen composites. *Mater. Sci. Eng. R Rep.* 57: 1–27.
- Curcelli EC, Müller SS, Ueda AK, Padovani CR, Maffei FH de A, Hossne WS. 2005. Effect of heparin-sodium and enoxaparin on rats tibial fracture healing: clinical, anatomopathological, and biomechanical approach. *Acta Ortopédica Bras.* 13: 13–16.
- Currey JD. 2002. *Bones: structure and mechanics*. Princeton University Press.
- Dai J, Rabie ABM. 2007. VEGF: an Essential Mediator of Both Angiogenesis and Endochondral Ossification. *J. Dent. Res.* 86: 937–950.
- Delaney MF. 2006. Strategies for the prevention and treatment of osteoporosis during early postmenopause. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 194: S12–S23.
- Dendorfer S, Maier HJ, Taylor D, Hammer J. 2008. Anisotropy of the fatigue behaviour of cancellous bone. *J. Biomech.* 41: 636–641.
- Dey P, Saphos CA, McDonnell J, Moore VL. 1992. Studies on the quantification of proteoglycans by the dimethylmethylene blue dye-Binding method specificity, quantitation in synovial lavage fluid, and automation. *Connect. Tissue Res.* 28: 317–324.

- Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. 2011. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med.* 9: 66.
- Domaschke H, Gelinsky M, Burmeister B, Fleig R, Hanke T, Reinstorf A, Pompe W, Rösen-Wolff A. 2006. In vitro ossification and remodeling of mineralized collagen I scaffolds. *Tissue Eng.* 12: 949–958.
- Dong X, Wang Q, Wu T, Pan H. 2007. Understanding Adsorption-Desorption Dynamics of BMP-2 on Hydroxyapatite (001) Surface. *Biophys. J.* 93: 750–759.
- Downs EC, Robertson NE, Riss TL, Plunkett ML. 1992. Calcium alginate beads as a slow-release system for delivering angiogenic molecules In Vivo and In Vitro. *J. Cell. Physiol.* 152: 422–429.
- Draget KI, Skjak-Braek G, Smidsrod O. 1997. Alginate based new materials. *Int. J. Biol. Macromol.* 21: 47–55.
- Drake CJ, Little CD. 1995. Exogenous vascular endothelial growth factor induces malformed and hyperfused vessels during embryonic neovascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 7657–7661.
- Du P, Hwang MP, Noh YK, Subbiah R, Kim IG, Bae SE, Park K. 2014. Fibroblast-derived matrix (FDM) as a novel vascular endothelial growth factor delivery platform. *J. Controlled Release* 194: 122–129.
- Ekaputra AK, Prestwich GD, Cool SM, Hutmacher DW. 2011. The three-dimensional vascularization of growth factor-releasing hybrid scaffold of poly (ϵ -caprolactone)/collagen fibers and hyaluronic acid hydrogel. *Biomaterials* 32: 8108–8117.
- Elcin AE, Elcin YM. 2006. Localized angiogenesis induced by human vascular endothelial growth factor-activated PLGA sponge. *Tissue Eng.* 12: 959–968.
- Elcin YM, Dixit V, Gitnick G. 2001. Extensive in vivo angiogenesis following controlled release of human vascular endothelial cell growth factor: implications for tissue engineering and wound healing. *Artif. Organs* 25: 558–565.
- Elia R, Fuegy PW, VanDelden A, Firpo MA, Prestwich GD, Peattie RA. 2010. Stimulation of in vivo angiogenesis by in situ crosslinked, dual growth factor-loaded, glycosaminoglycan hydrogels. *Biomaterials* 31: 4630–4638.

- Embery G, Rölla G, Stanbury JB. 1979. Interaction of acid glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) with hydroxyapatite. *Scand. J. Dent. Res.* 87: 318–324.
- Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton MW. 2005. Allograft and alloplastic bone substitutes: a review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon. *J. Craniofac. Surg.* 16: 981–989.
- Farokhi M, Mottaghitalab F, Ai J, Shokrgozar MA. 2013. Sustained release of platelet-derived growth factor and vascular endothelial growth factor from silk/calcium phosphate/PLGA based nanocomposite scaffold. *Int. J. Pharm.* 454: 216–225.
- Fernandez-Yague MA, Abbah SA, McNamara L, Zeugolis DI, Pandit A, Biggs MJ. 2014. Biomimetic approaches in bone tissue engineering: integrating biological and physicommechanical strategies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 16: S0169–409X.
- Ferrara N. 1999. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J. Mol. Med.* 77: 527–543.
- Fidkowski C, Kaazempur-Mofrad MR, Borenstein J, Vacanti JP, Langer R, Wang Y. 2005. Endothelialized microvasculature based on a biodegradable elastomer. *Tissue Eng.* 11: 302–309.
- Fiedler J, Leucht F, Waltenberger J, Dehio C, Brenner RE. 2005. VEGF-A and PlGF-1 stimulate chemotactic migration of human mesenchymal progenitor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334: 561–568.
- Fiedler J, Röderer G, Günther K-P, Brenner R. 2002. BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. *J. Cell. Biochem.* 87: 305–312.
- Filvaroff EH. 2003. VEGF and bone. *J. Musculoskelet. NEURONAL Interact.* 3: 304–307.
- Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. 2006. Buried alive: How osteoblasts become osteocytes. *Dev. Dyn.* 235: 176–190.
- Freeman I, Kedem A, Cohen S. 2008. The effect of sulfation of alginate hydrogels on the specific binding and controlled release of heparin-binding proteins. *Biomaterials* 29: 3260–3268.
- Fromm JR, Hileman RE, Caldwell EEO, Weiler JM, Linhardt RJ. 1997. Pattern and spacing of basic amino acids in heparin binding sites. *Arch. Biochem. Biophys.* 343: 92–100.
- Fujioka K, Maeda M, Hojo T, Sano A. 1998. Protein release from collagen matrices. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 31: 247–266.

- Fu Y-C, Nie H, Ho M-L, Wang C-K, Wang C-H. 2008. Optimized bone regeneration based on sustained release from three-dimensional fibrous PLGA/HAp composite scaffolds loaded with BMP-2. *Biotechnol. Bioeng.* 99: 996–1006.
- Gabrielyan A, Knaak S, Gelinsky M, Arnhold S, Rösen-Wolff A. 2014. Hypoxia-conditioned media allows species-specific attraction of bone marrow stromal cells without need for recombinant proteins. *BMC Vet. Res.* 10: 56.
- Garrett Q, Simmons PA, Xu S, Vehige J, Zhao Z, Ehrmann K, Willcox M. 2007. Carboxymethyl-cellulose binds to human corneal epithelial cells and is a modulator of corneal epithelial wound healing. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48: 1559–1567.
- Gasperini L, Mano JF, Reis RL. 2014. Natural polymers for the microencapsulation of cells. *J. R. Soc. Interface* 11: 20140817–20140817.
- Geiger F, Bertram H, Berger I, Lorenz H, Wall O, Eckhardt C, Simank H-G, Richter W. 2005. Vascular Endothelial Growth Factor Gene-Activated Matrix (VEGF165-GAM) Enhances Osteogenesis and Angiogenesis in Large Segmental Bone Defects. *J. Bone Miner. Res.* 20: 2028–2035.
- Gelinsky M, Lode A, Bernhardt A, Rösen-Wolff A. 2011. Stem Cell Engineering for Regeneration of Bone Tissue. In: Artmann GM, Minger S, und Hescheler J, editors. *Stem Cell Engineering*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p 383–399.
- Gelinsky M, Welzel PB, Simon P, Bernhardt A, König U. 2008. Porous three-dimensional scaffolds made of mineralised collagen: Preparation and properties of a biomimetic nanocomposite material for tissue engineering of bone. *Chem. Eng. J.* 137: 84–96.
- Gelse K. 2003. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55: 1531–1546.
- Gerber H-P, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. 1999. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat. Med.* 5: 623–628.
- Gerhardt H. 2003. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J. Cell Biol.* 161: 1163–1177.
- Gerritsen ME, Soriano R, Yang S, Zlot C, Ingle G, Toy K, Williams PM. 2003. Branching Out: A Molecular Fingerprint of Endothelial Differentiation into Tube-Like Structures Generated by Affymetrix Oligonucleotide Arrays. *Microcirculation* 10: 63–81.

- Giordano A, Galderisi U, Marino IR. 2007. From the laboratory bench to the patient's bedside: An update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J. Cell. Physiol.* 211: 27–35.
- Gitay-Goren H, Soker S, Vlodavsky I, Neufeld G. 1992. The binding of vascular endothelial growth factor to its receptors is dependent on cell surface-associated heparin-like molecules. *J. Biol. Chem.* 267: 6093–6098.
- Glowacki J, Mizuno S. 2008. Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers* 89: 338–344.
- Grayson WL, Martens TP, Eng GM, Radisic M, Vunjak-Novakovic G. 2009. Biomimetic approach to tissue engineering. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20: 665–673.
- Green CE, Liu T, Montel V, Hsiao G, Lester RD, Subramaniam S, Gonias SL, Klemke RL. 2009. Chemoattractant Signaling between Tumor Cells and Macrophages Regulates Cancer Cell Migration, Metastasis and Neovascularization. *PLoS ONE* 4: e6713.
- Griffith GC, Nichols G, Asher JD, Flanagan B. 1965. HEPARIN OSTEOPOROSIS. *JAMA* 193: 91–94.
- Grünewald FS, Prota AE, Giese A, Ballmer-Hofer K. 2010. Structure–function analysis of VEGF receptor activation and the role of coreceptors in angiogenic signaling. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* 1804: 567–580.
- Gu F, Amsden B, Neufeld R. 2004. Sustained delivery of vascular endothelial growth factor with alginate beads. *J. Controlled Release* 96: 463–472.
- Gümüşderelioğlu M, Aday S. 2011. Heparin-functionalized chitosan scaffolds for bone tissue engineering. *Carbohydr. Res.* 346: 606–613.
- Hadjidakis DJ, Androulakis II. 2006. Bone Remodeling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1092: 385–396.
- Hall JE, Guyton AC. 2011. Guyton and Hall textbook of medical physiology. Philadelphia, Pa.: Saunders/Elsevier.
- Hannan GN, Reilly W. 1988. Adsorption from fetal calf serum of collagen-like proteins which bind fibronectin and promote cell attachment. *Exp. Cell Res.* 178: 343–357.
- Harada S, Rodan GA. 2003. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423: 349–355.

- Harley BA, Lynn AK, Wissner-Gross Z, Bonfield W, Yannas IV, Gibson LJ. 2009. Design of a multiphase osteochondral scaffold. II. Fabrication of a mineralized collagen-glycosaminoglycan scaffold. *J. Biomed. Mater. Res. A* 92: 1078–1093.
- Hausser H-J, Brenner RE. 2004. Low doses and high doses of heparin have different effects on osteoblast-like Saos-2 cells in vitro. *J. Cell. Biochem.* 91: 1062–1073.
- Hawkins D, Evans J. 2005. Minimising the risk of heparin-induced osteoporosis during pregnancy. *Expert Opin. Drug Saf.* 4: 583–590.
- Hench LL. 2005. *Biomaterials, artificial organs and tissue engineering*. Cambridge : Woodhead Publ.
- He X, Dziak R, Yuan X, Mao K, Genco R, Swihart M, Sarkar D, Li C, Wang C, Lu L, Andreadis S, Yang S. 2013. BMP2 Genetically Engineered MSCs and EPCs Promote Vascularized Bone Regeneration in Rat Critical-Sized Calvarial Bone Defects. *PLoS ONE* 8: e60473.
- Hofmann A, Mattyasovszky SG, Brüning C, Ritz U, Mehling I, Meurer A, Rommens PM. 2009. Osteoblasten: Zelluläre und molekulare Regulationsmechanismen in der Frakturheilung. *Orthop.* 38: 1009–1019.
- Horowitz JR, Rivard A, Zee R van der, Hariawala M, Sheriff DD, Esakof DD, Chaudhry GM, Symes JF, Isner JM. 1997. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor produces nitric oxide-dependent hypotension. Evidence for a maintenance role in quiescent adult endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 2793–2800.
- Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. 1992. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J. Biol. Chem.* 267: 26031–26037.
- Hutmacher DW. 2000. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 21: 2529–2543.
- Hutmacher DW. 2001. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues state of the art and future perspectives. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 12: 107–124.
- Iozzo RV. 1997. The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 32: 141–174.
- Irie A, Takami M, Kubo H, Sekino-Suzuki N, Kasahara K, Sanai Y. 2007. Heparin enhances osteoclastic bone resorption by inhibiting osteoprotegerin activity. *Bone* 41: 165–174.

- Jackson RA, Nurcombe V, Cool SM. 2006. Coordinated fibroblast growth factor and heparan sulfate regulation of osteogenesis. *Gene* 379: 79–91.
- Jackson RL, Busch SJ, Cardin AD. 1991. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiol Rev* 71: 481–539.
- Jakob F, Ebert R, Rudert M, Nöth U, Walles H, Docheva D, Schieker M, Meinel L, Groll J. 2012. In situ guided tissue regeneration in musculoskeletal diseases and aging: Implementing pathology into tailored tissue engineering strategies. *Cell Tissue Res.* 347: 725–735.
- Jefferys EG, Brian PW, Hemming HG, Lowe D. 1953. Antibiotic production by the microfungi of acid heath soils. *J. Gen. Microbiol.* 9: 314–341.
- Ji JA, Liu J, Shire SJ, Kamerzell TJ, Hong S, Billeci K, Shen Y, Wang YJ. 2010. Characteristics of rhVEGF Release from Topical Hydrogel Formulations. *Pharm. Res.* 27: 644–654.
- Jin G, Bausch D, Knightly T, Liu Z, Li Y, Liu B, Lu J, Chong W, Velmahos GC, Alam HB. 2011. Histone deacetylase inhibitors enhance endothelial cell sprouting angiogenesis in vitro. *Surgery* 150: 429–435.
- Johnson MR, Boerckel JD, Dupont KM, Guldberg RE. 2011. Functional Restoration of Critically Sized Segmental Defects With Bone Morphogenetic Protein-2 and Heparin Treatment. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 469: 3111–3117.
- Jones AC, Arns CH, Hutmacher DW, Milthorpe BK, Sheppard AP, Knackstedt MA. 2009. The correlation of pore morphology, interconnectivity and physical properties of 3D ceramic scaffolds with bone ingrowth. *Biomaterials* 30: 1440–1451.
- Jones JR, Hench LL. 2003. Regeneration of trabecular bone using porous ceramics. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 7: 301–307.
- Jorgensen LG, Sandberg Sorensen J, Lorentzen JE. 1991. Clinical and pharmacokinetic evaluation of gentamycin containing collagen in groin wound infections after vascular reconstruction. *Eur. J. Vasc. Surg.* 5: 87–91.
- Kalfas IH. 2001. Principles of bone healing. *Neurosurg. Focus* 10: 1–4.
- Kamei K, Wu X, Xu X, Minami K, Huy NT, Takano R, Kato H, Hara S. 2001. The Analysis of Heparin–Protein Interactions Using Evanescent Wave Biosensor with Regioselectively Desulfated Heparins as the Ligands. *Anal. Biochem.* 295: 203–213.

Kanczler JM, Oreffo RO. 2008. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater* 15: 100–114.

Kanematsu A, Marui A, Yamamoto S, Ozeki M, Hirano Y, Yamamoto M, Ogawa O, Komeda M, Tabata Y. 2004. Type I collagen can function as a reservoir of basic fibroblast growth factor. *J. Controlled Release* 99: 281–292.

Kanungo BP, Gibson LJ. 2009. Density–property relationships in mineralized collagen–glycosaminoglycan scaffolds. *Acta Biomater.* 5: 1006–1018.

Kaullly T, Kaufman-Francis K, Lesman A, Levenberg S. 2009. Vascularization—the conduit to viable engineered tissues. *Tissue Eng. Part B Rev.* 15: 159–169.

Keating A. 2006. Mesenchymal stromal cells. *Curr. Opin. Hematol.* 13: 419–425.

Kempen DHR, Lu L, Heijink A, Hefferan TE, Creemers LB, Maran A, Yaszemski MJ, Dhert WJA. 2009. Effect of local sequential VEGF and BMP-2 delivery on ectopic and orthotopic bone regeneration. *Biomaterials* 30: 2816–2825.

Kilpadi KL, Chang P-L, Bellis SL. 2001. Hydroxylapatite binds more serum proteins, purified integrins, and osteoblast precursor cells than titanium or steel. *J. Biomed. Mater. Res.* 57: 258–267.

Kim JK, Kim HJ, Chung J-Y, Lee J-H, Young S-B, Kim Y-H. 2014. Natural and synthetic biomaterials for controlled drug delivery. *Arch. Pharm. Res.* 37: 60–68.

Klagsbrun M, D'Amore PA. 1996. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 7: 259–270.

Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E, Horch RE. 2006. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *J. Cell. Mol. Med.* 10: 7–19.

Ko IK, Ju YM, Chen T, Atala A, Yoo JJ, Lee SJ. 2012. Combined systemic and local delivery of stem cell inducing/recruiting factors for in situ tissue regeneration. *FASEB J.* 26: 158–168.

Ko IK, Lee SJ, Atala A, Yoo JJ. 2013. In situ tissue regeneration through host stem cell recruitment. *Exp. Mol. Med.* 45: e57.

König U, Lode A, Welzel PB, Ueda Y, Knaack S, Henß A, Hauswald A, Gelinsky M. 2014. Heparinization of a biomimetic bone matrix: integration of heparin during matrix synthesis versus adsorptive post surface modification. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 25: 607–621.

Kretlow JD, Klouda L, Mikos AG. 2007. Injectable matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59: 263–273.

Kuhn LT, Ou G, Charles L, Hurley MM, Rodner CM, Gronowicz G. 2013. Fibroblast Growth Factor-2 and Bone Morphogenetic Protein-2 Have a Synergistic Stimulatory Effect on Bone Formation in Cell Cultures From Elderly Mouse and Human Bone. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 68: 1170–1180.

Kumarasuriyar A, Murali S, Nurcombe V, Cool SM. 2009. Glycosaminoglycan composition changes with MG-63 osteosarcoma osteogenesis in vitro and induces human mesenchymal stem cell aggregation. *J. Cell. Physiol.* 218: 501–511.

Langer R. 1993. Tissue Engineering. *Science* 260: 5110.

Laschober GT, Brunauer R, Jamnig A, Singh S, Hafen U, Fehrer C, Kloss F, Gassner R, Lepperdinger G. 2011. Age-Specific Changes of Mesenchymal Stem Cells Are Paralleled by Up-regulation of CD106 Expression As a Response to an Inflammatory Environment. *Rejuvenation Res.* 14: 119–131.

Laurencin C, Khan Y, El-Amin SF. 2006. Bone graft substitutes. *Expert Rev. Med. Devices* 3: 49–57.

Lee H, Chung HJ, Park TG. 2007. Perspectives On: Local and Sustained Delivery of Angiogenic Growth Factors. *J. Bioact. Compat. Polym.* 22: 89–114.

Lee KW, Yoon JJ, Lee JH, Kim SY, Jung HJ, Kim SJ, Joh JW, Lee HH, Lee DS, Lee SK. 2004. Sustained release of vascular endothelial growth factor from calcium-induced alginate hydrogels reinforced by heparin and chitosan. *Transplant. Proc.* 36: 2464–2465.

Lee KY, Peters MC, Mooney DJ. 2003. Comparison of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in SCID mice. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 87: 49–56.

Lee YJ, Lee J-H, Cho H-J, Kim HK, Yoon TR, Shin H. 2013. Electrospun fibers immobilized with bone forming peptide-1 derived from BMP7 for guided bone regeneration. *Biomaterials* 34: 5059–5069.

Lepperdinger G, Brunauer R, Jamnig A, Laschober G, Kassem M. 2008. Controversial issue: Is it safe to employ mesenchymal stem cells in cell-based therapies? *Exp. Gerontol.* 43: 1018–1023.

- Levenberg S, Langer R. 2004. Advances in tissue engineering. *Curr. Top. Dev. Biol.* 61: 113–134.
- Linhardt RJ, Murugesan S, Xie J. 2008. Immobilization of heparin: approaches and applications. *Curr. Top. Med. Chem.* 8: 80–100.
- Liu Z-M, Gu Q, Xu Z-K, Groth T. 2010. Synergistic Effect of Polyelectrolyte Multilayers and Osteogenic Growth Medium on Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Macromol. Biosci.* 10: 1043–1054.
- Lode A, Reinstorf A, Bernhardt A, Wolf-Brandstetter C, König U, Gelinsky M. 2008. Heparin modification of calcium phosphate bone cements for VEGF functionalization. *J. Biomed. Mater. Res. A* 86A: 749–759.
- Lu C, Xing Z, Yu Y, Colnot C, Miclau T, Marcucio RS. 2009. Recombinant human bone morphogenetic protein-7 enhances fracture healing in an ischemic environment. *J. Orthop. Res.* 28: 687–696.
- Lutolf MP, Weber FE, Schmoekel HG, Schense JC, Kohler T, Müller R, Hubbell JA. 2003. Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices. *Nat. Biotechnol.* 21: 513–518.
- Mackie EJ. 2003. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35: 1301–1305.
- Madry H, Rey-Rico A, Venkatesan JK, Johnstone B, Cucchiaroni M. 2014. Transforming Growth Factor Beta-Releasing Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Eng. Part B Rev.* 20: 106–125.
- Mao JJ. 2008. Translational approaches in tissue engineering and regenerative medicine. Boston, Mass ; London : Artech House.
- Marin-Padilla M. 1985. Early vascularization of the embryonic cerebral cortex: Golgi and electron microscopic studies. *J. Comp. Neurol.* 241: 237–249.
- Martin P. 1997. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276: 75–81.
- Mastrogiacomo M, Muraglia A, Komlev V, Peyrin F, Rustichelli F, Crovace A, Cancedda R. 2005. Tissue engineering of bone: search for a better scaffold. *Orthod. Craniofac. Res.* 8: 277–284.

Mathews MB. 1965. The interaction of collagen and acid mucopolysaccharides. A model for connective tissue. *Biochem J* 96: 710–716.

Mathews S, Mathew SA, Gupta PK, Bhonde R, Totey S. 2014. Glycosaminoglycans enhance osteoblast differentiation of bone marrow derived human mesenchymal stem cells. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 8: 143–152.

Mayr-Wohlfart U, Waltenberger J, Hausser H, Kessler S, Günther KP, Dehio C, Puhl W, Brenner RE. 2002. Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. *Bone* 30: 472–477.

McPherson JM, Sawamura SJ, Condell RA, Rhee W, Wallace DG. 1988. The effects of heparin on the physicochemical properties of reconstituted collagen. *Coll. Relat. Res.* 8: 65–82.

Mehta M, Schmidt-Bleek K, Duda GN, Mooney DJ. 2012. Biomaterial delivery of morphogens to mimic the natural healing cascade in bone. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64: 1257–1276.

Meyer U, Handschel J, Wiesmann HP, Meyer T. 2009. *Fundamentals of tissue engineering and regenerative medicine*. Springer.

Meyer U, Wiesmann HP. 2006. *Bone and Cartilage Engineering*. Springer Berlin Heidelberg.

Midy V, Plouët J. 1994. Vasculotropin/vascular endothelial growth factor induces differentiation in cultured osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199: 380–386.

Miron RJ, Zhang YF. 2012. Osteoinduction: A Review of Old Concepts with New Standards. *J. Dent. Res.* 91: 736–744.

Mishima Y, Lotz M. 2008. Chemotaxis of human articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 26: 1407–1412.

Mourkioti F, Rosenthal N. 2005. IGF-1, inflammation and stem cells: interactions during muscle regeneration. *Trends Immunol.* 26: 535–542.

Muir JM, Hirsh J, Weitz JI, Andrew M, Young E, Shaughnessy SG. 1997. A histomorphometric comparison of the effects of heparin and low-molecular-weight heparin on cancellous bone in rats. *Blood* 89: 3236–3242.

Al-Munajjed AA, O'Brien FJ. 2009. Influence of a novel calcium-phosphate coating on the mechanical properties of highly porous collagen scaffolds for bone repair. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2: 138–146.

- Muschler GF, Nitto H, Boehm CA, Easley KA. 2001. Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 19: 117–125.
- Nassif N, Gobeaux F, Seto J, Belamie E, Davidson P, Panine P, Mosser G, Fratzl P, Giraud Guille M-M. 2010. Self-Assembled Collagen–Apatite Matrix with Bone-like Hierarchy. *Chem. Mater.* 22: 3307–3309.
- Nie T, Baldwin A, Yamaguchi N, Kiick KL. 2007. Production of heparin-functionalized hydrogels for the development of responsive and controlled growth factor delivery systems. *J. Controlled Release* 122: 287–296.
- Nikitovic D, Zafiropoulos A, Tzanakakis GN, Karamanos NK, Tsatsakis AM. 2005. Effects of glycosaminoglycans on cell proliferation of normal osteoblasts and human osteosarcoma cells depend on their type and fine chemical compositions. *Anticancer Res.* 25: 2851–2856.
- Nimmo CM, Owen SC, Shoichet MS. 2011. Diels–Alder Click Cross-Linked Hyaluronic Acid Hydrogels for Tissue Engineering. *Biomacromolecules* 12: 824–830.
- Nishida S, Endo N, Yamagiwa H, Tanizawa T, Takahashi HE. 1999. Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation. *J. Bone Miner. Metab.* 17: 171–177.
- Nochos A, Douroumis D, Bouropoulos N. 2008. In vitro release of bovine serum albumin from alginate/HPMC hydrogel beads. *Carbohydr. Polym.* 74: 451–457.
- Novosel EC, Kleinhans C, Kluger PJ. 2011. Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63: 300–311.
- Öbrink B. 1973. A study of the interactions between monomeric tropocollagen and glycosaminoglycans. *Eur. J. Biochem.* 33: 387–400.
- Odedra D, Chiu LLY, Shoichet M, Radisic M. 2011. Endothelial cells guided by immobilized gradients of vascular endothelial growth factor on porous collagen scaffolds. *Acta Biomater.* 7: 3027–3035.
- Ohta M, Suzuki Y, Chou H, Ishikawa N, Suzuki S, Tanihara M, Suzuki Y, Mizushima Y, Dezawa M, Ide C. 2004. Novel heparin/alginate gel combined with basic fibroblast growth factor promotes nerve regeneration in rat sciatic nerve. *J. Biomed. Mater. Res.* 71A: 661–668.

- Orban JM, Marra KG, Hollinger JO. 2002. Composition options for tissue-engineered bone. *Tissue Eng.* 8: 529–539.
- Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. 2014. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J. Orthop. Surg.* 9: 18.
- Otsuru S, Tamai K, Yamazaki T, Yoshikawa H, Kaneda Y. 2008. Circulating Bone Marrow-Derived Osteoblast Progenitor Cells Are Recruited to the Bone-Forming Site by the CXCR4/Stromal Cell-Derived Factor-1 Pathway. *Stem Cells* 26: 223–234.
- Ozawa CR, Banfi A, Glazer NL, Thurston G, Springer ML, Kraft PE, McDonald DM, Blau HM. 2004. Microenvironmental VEGF concentration, not total dose, determines a threshold between normal and aberrant angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 113: 516–527.
- Pakulska MM, Ballios BG, Shoichet MS. 2012. Injectable hydrogels for central nervous system therapy. *Biomed. Mater.* 7: 024101.
- Pardue EL, Ibrahim S, Ramamurthi A. 2008. Role of hyaluronan in angiogenesis and its utility to angiogenic tissue engineering. *Organogenesis* 4: 203.
- Park JE, Keller G-A, Ferrara N. 1993. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol. Biol. Cell* 4: 1317–1326.
- Patel NN, Butler PEM, Buttery L, Polak JM, Tolley NS. 2002. Tissue engineering and ENT surgery. *J. Laryngol. Otol.* 116: 165–169.
- Peattie RA, Nayate AP, Firpo MA, Shelby J, Fisher RJ, Prestwich GD. 2004. Stimulation of in vivo angiogenesis by cytokine-loaded hyaluronic acid hydrogel implants. *Biomaterials* 25: 2789–2798.
- Peattie RA, Pike DB, Yu B, Cai S, Shu XZ, Prestwich GD, Firpo MA, Fisher RJ. 2008. Effect of Gelatin on Heparin Regulation of Cytokine Release from Hyaluronan-Based Hydrogels. *Drug Deliv.* 15: 389–397.
- Peters MC, Isenberg BC, Rowley JA, Mooney DJ. 1998. Release from alginate enhances the biological activity of vascular endothelial growth factor. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 9: 1267–1278.

- Pike DB, Cai S, Pomraning KR, Firpo MA, Fisher RJ, Shu XZ, Prestwich GD, Peattie RA. 2006. Heparin-regulated release of growth factors in vitro and angiogenic response in vivo to implanted hyaluronan hydrogels containing VEGF and bFGF. *Biomaterials* 27: 5242–5251.
- Porter JR, Ruckh TT, Popat KC. 2009. Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnol. Prog.* 25: 1539–1560.
- PROMEGA. 2012. CytoTox96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay. Promega Corp. USA.
- Pullisaar H, Reseland JE, Haugen HJ, Brinchmann JE, Østrup E. 2014. Simvastatin coating of TiO₂ scaffold induces osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 447: 139–144.
- Rabbany SY, Pastore J, Yamamoto M, Miller T, Rafii S, Aras R, Penn M. 2010. Continuous Delivery of Stromal Cell-Derived Factor-1 From Alginate Scaffolds Accelerates Wound Healing. *Cell Transplant.* 19: 399–408.
- Rees SG, Hughes Wassell DT, Embery G. 2002. Interaction of glucuronic acid and iduronic acid-rich glycosaminoglycans and their modified forms with hydroxyapatite. *Biomaterials* 23: 481–489.
- Rho JY, Kuhn-Spearing L, Zioupos P. 1998. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Med. Eng. Phys.* 20: 92–102.
- Rivron NC, Liu J, Rouwkema J, Boer de J, Blitterswijk van C. 2008. Engineering vascularised tissues in vitro. *Eur. Cell. Mater.* 15: 27–40.
- Robinson CJ, Stringer SE. 2001. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J. Cell Sci.* 114: 853–865.
- Roy H, Bhardwaj S, Ylä-Herttuala S. 2006. Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett.* 580: 2879–2887.
- Rubin AL, Stenzel KH, Miyata T, White MJ, Dunn M. 1973. Collagen as a vehicle for drug delivery. Preliminary report. *J. Clin. Pharmacol.* 13: 309–312.
- Ruozi B, Parma B, Croce MA, Tosi G, Bondioli L, Vismara S, Forni F, Vandelli MA. 2009. Collagen-based modified membranes for tissue engineering: Influence of type and molecular weight of GAGs on cell proliferation. *Int. J. Pharm.* 378: 108–115.
- Rusnati M, Presta M. 2014. Angiogenic growth factors interactome and drug discovery: The contribution of surface plasmon resonance. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14: 00161–0.

- Safadi FF, Barbe MF, Abdelmagid SM, Rico MC, Aswad RA, Litvin J, Popoff SN. 2009. Bone Structure, Development and Bone Biology. In: Khurana JS, editors. Bone Pathology, Totowa, NJ: Humana Press, p 1–50.
- Sakiyama-Elbert SE, Hubbell JA. 2000. Controlled release of nerve growth factor from a heparin-containing fibrin-based cell ingrowth matrix. *J. Controlled Release* 69: 149–158.
- San Antonio JD, Lander AD, Karnovsky MJ, Slayter HS. 1994. Mapping the heparin-binding sites on type I collagen monomers and fibrils. *J. Cell Biol.* 125: 1179–1188.
- Santos MI, Reis RL. 2010. Vascularization in Bone Tissue Engineering: Physiology, Current Strategies, Major Hurdles and Future Challenges. *Macromol. Biosci.* 10: 12–27.
- Sasisekharan R, Moses MA, Nugent MA, Cooney CL, Langer R. 1994. Heparinase inhibits neovascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 1524–1528.
- Schaffler MB, Cheung W-Y, Majeska R, Kennedy O. 2014. Osteocytes: Master Orchestrators of Bone. *Calcif. Tissue Int.* 94: 5–24.
- Schliephake H, Neukam FW, Klosa D. 1991. Influence of pore dimensions on bone ingrowth into porous hydroxylapatite blocks used as bone graft substitutes. A histometric study. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 20: 53–58.
- Schmidt-Rohlfing B, Tzioupis C, Menzel CL, Pape HC. 2009. Tissue Engineering von Knochengewebe: Prinzipien und klinische Anwendungsmöglichkeiten. *Unfallchirurg* 112: 785–795.
- Schönherr E, Hausser H-J. 2000. Extracellular matrix and cytokines: a functional unit. *J. Immunol. Res.* 7: 89–101.
- Schuch G, Machluf M, Bartsch Jr G, Nomi M, Richard H, Atala A, Soker S. 2002. In vivo administration of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its antagonist, soluble neuropilin-1, predicts a role of VEGF in the progression of acute myeloid leukemia in vivo. *Blood* 100: 4622–4628.
- Shamloo A, Ma N, Poo M, Sohn LL, Heilshorn SC. 2008. Endothelial cell polarization and chemotaxis in a microfluidic device. *Lab. Chip* 8: 1292–1299.
- Shen YH, Shoichet MS, Radisic M. 2008. Vascular endothelial growth factor immobilized in collagen scaffold promotes penetration and proliferation of endothelial cells. *Acta Biomater.* 4: 477–489.

- Sheridan MH, Shea LD, Peters MC, Mooney DJ. 2000. Bioabsorbable polymer scaffolds for tissue engineering capable of sustained growth factor delivery. *J. Controlled Release* 64: 91–102.
- Shima DT, Deutsch U, D'Amore PA. 1995. Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability. *FEBS Lett.* 370: 203–208.
- Shu ZX, Liu Y, Palumbo FS, Luo Y, Prestwich GD. 2004. In situ crosslinkable hyaluronan hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials* 25: 1339–1348.
- Simón-Yarza T, Formiga FR, Tamayo E, Pelacho B, Prosper F, Blanco-Prieto MJ. 2012. Vascular endothelial growth factor-delivery systems for cardiac repair: an overview. *Theranostics* 2: 541.
- Singh S, Wu BM, Dunn JCY. 2011. Accelerating Vascularization in Polycaprolactone Scaffolds by Endothelial Progenitor Cells. *Tissue Eng. Part A* 17: 1819–1830.
- Sohier J, Moroni L, Blitterswijk C van, Groot K de, Bezemer JM. 2008. Critical factors in the design of growth factor releasing scaffolds for cartilage tissue engineering. *Expert Opin Drug Deliv.* 5: 543–566.
- Stamov D, Grimmer M, Salchert K, Pompe T, Werner C. 2008. Heparin intercalation into reconstituted collagen I fibrils: Impact on growth kinetics and morphology. *Biomaterials* 29: 1–14.
- Stamov DR, Khoa Nguyen TA, Evans HM, Pfohl T, Werner C, Pompe T. 2011. The impact of heparin intercalation at specific binding sites in telopeptide-free collagen type I fibrils. *Biomaterials* 32: 7444–7453.
- Stancu I-C, Dragusin DM, Vasile E, Trusca R, Antoniac I, Vasilescu DS. 2011. Porous calcium alginate–gelatin interpenetrated matrix and its biomineralization potential. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 22: 451–460.
- Steffens GCM, Yao C, Prevel P, Markowicz M, Schenck P, Noah EM, Pallua N. 2004. Modulation of angiogenic potential of collagen matrices by covalent incorporation of heparin and loading with vascular endothelial growth factor. *Tissue Eng.* 10: 1502–1509.
- Stegen S, Gastel N van, Carmeliet G. 2014. Bringing new life to damaged bone: The importance of angiogenesis in bone repair and regeneration. *Bone.* 70: 19–27.

- Stevens M. 2005. The Stevens Group - Innovating Biomaterials Design for Regenerative Medicine and Biosensing. Aufruf am 23.01.2015 URL: <http://www.stevensgroup.org/index.php/research/bioactive>.
- Stolzing A, Jones E, McGonagle D, Scutt A. 2008. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech. Ageing Dev.* 129: 163–173.
- Street J, Bao M, Bunting S, Peale FV, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, Bruggen N van, others. 2002. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 9656–9661.
- Sundelacruz S, Kaplan DL. 2009. Stem cell- and scaffold-based tissue engineering approaches to osteochondral regenerative medicine. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20: 646–655.
- Sun P, Wang J, Zheng Y, Fan Y, Gu Z. 2012. BMP2/7 heterodimer is a stronger inducer of bone regeneration in peri-implant bone defects model than BMP2 or BMP7 homodimer. *Dent. Mater. J.* 31: 239–248.
- Sun X, Kang Y, Bao J, Zhang Y, Yang Y, Zhou X. 2013. Modeling vascularized bone regeneration within a porous biodegradable CaP scaffold loaded with growth factors. *Biomaterials* 34: 4971–4981.
- Sweeney SM, Guy CA, Fields GB, San Antonio JD. 1998. Defining the domains of type I collagen involved in heparin-binding and endothelial tube formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 7275–7280.
- Tabata Y. 2003. Tissue regeneration based on growth factor release. *Tissue Eng.* 9: 5–15.
- Tae G, Scatena M, Stayton PS, Hoffman AS. 2006. PEG-cross-linked heparin is an affinity hydrogel for sustained release of vascular endothelial growth factor. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 17: 187–197.
- Taipale J, Keski-Oja J. 1997. Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J.* 11: 51–59.
- Tanihara M, Suzuki Y, Yamamoto E, Noguchi A, Mizushima Y. 2001. Sustained release of basic fibroblast growth factor and angiogenesis in a novel covalently crosslinked gel of heparin and alginate. *J. Biomed. Mater. Res.* 56: 216–221.
- Tayalia P, Mooney DJ. 2009. Controlled growth factor delivery for tissue engineering. *Adv. Mater.* 21: 3269–3285.

- Teixeira S, Yang L, Dijkstra PJ, Ferraz MP, Monteiro FJ. 2010. Heparinized hydroxyapatite/collagen three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 21: 2385–2392.
- Tessler S, Rockwell P, Hicklin D, Cohen T, Levi B-Z, Witte L, Lemischka IR, Neufeld G. 1994. Heparin modulates the interaction of VEGF165 with soluble and cell associated flk-1 receptors. *J. Biol. Chem.* 269: 12456–12461.
- Tevlin R, McArdle A, Atashroo D, Walmsley GG, Senarath-Yapa K, Zielins ER, Paik KJ, Longaker MT, Wan DC. 2014. Biomaterials for Craniofacial Bone Engineering. *J. Dent. Res.* 93: 1187–1195.
- Thieme S, Ryser M, Gentsch M, Navratil K, Brenner S, Stiehler M, Rölting J, Gelinsky M, Rösen-Wolff A. 2009. Stromal Cell-Derived Factor-1 α -Directed Chemoattraction of Transiently CXCR4-Overexpressing Bone Marrow Stromal Cells into Functionalized Three-Dimensional Biomimetic Scaffolds. *Tissue Eng. Part C Methods* 15: 687–696.
- Tomme SR Van, Storm G, Hennink WE. 2008. In situ gelling hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications. *Int. J. Pharm.* 355: 1–18.
- Tomoyasu A, Higashio K, Kanomata K, Goto M, Kodaira K, Serizawa H, Suda T, Nakamura A, Nojima J, Fukuda T, Katagiri T. 2007. Platelet-rich plasma stimulates osteoblastic differentiation in the presence of BMPs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 361: 62–67.
- Tønnesen HH, Karlsen J. 2002. Alginate in drug delivery systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 28: 621–630.
- Trowbridge JM, Gallo RL. 2002. Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan. *Glycobiology* 12: 117R–25R.
- Uebersax L, Merkle HP, Meinel L. 2009. Biopolymer-based growth factor delivery for tissue repair: from natural concepts to engineered systems. *Tissue Eng. Part B Rev.* 15: 263–289.
- Vanden Berg-Foels WS. 2014. *In Situ* Tissue Regeneration: Chemoattractants for Endogenous Stem Cell Recruitment. *Tissue Eng. Part B Rev.* 20: 28–39.
- Vater C. 2009. Biologische Charakterisierung neuartiger nanokristalliner Calciumphosphatzeemente für die Knochenregeneration. Technische Universität Dresden Dissertation.
- Vo TN, Kasper FK, Mikos AG. 2012. Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64: 1292–1309.

- Wang Y, Lapitsky Y, Kang CE, Shoichet MS. 2009. Accelerated release of a sparingly soluble drug from an injectable hyaluronan–methylcellulose hydrogel. *J. Controlled Release* 140: 218–223.
- Wang Y, Wan C, Deng L, Liu X, Cao X, Gilbert SR, Boussein ML, Faugere M-C, Guldberg RE, Gerstenfeld LC, Haase VH, Johnson RS, et al. 2007. The hypoxia-inducible factor α pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J. Clin. Invest.* 117: 1616–1626.
- Wang Y, Wei YT, Zu ZH, Ju RK, Guo MY, Wang XM, Xu QY, Cui FZ. 2011. Combination of hyaluronic acid hydrogel scaffold and PLGA microspheres for supporting survival of neural stem cells. *Pharm. Res.* 28: 1406–1414.
- Weiner S, Wagner HD. 1998. The material bone: structure-mechanical function relations. *Annu. Rev. Mater. Sci.* 28: 271–298.
- Wernike E, Montjovent MO, Liu Y, Wismeijer D, Hunziker EB, Siebenrock KA, Hofstetter W, Klenke FM. 2010. VEGF incorporated into calcium phosphate ceramics promotes vascularisation and bone formation in vivo. *Eur Cell Mater* 19: 30–40.
- Wiel HE van der, Lips P, Huijgens PC, Netelenbos JC. 1993. Effects of short-term low-dose heparin administration on biochemical parameters of bone turnover. *Bone Miner.* 22: 27–32.
- Wissink MJB, Beernink R, Pieper JS, Poot AA, Engbers GHM, Beugeling T, Aken WG Van, Feijen J. 2001. Binding and release of basic fibroblast growth factor from heparinized collagen matrices. *Biomaterials* 22: 2291–2299.
- Wolf-Brandstetter C, Lode A, Hanke T, Scharnweber D, Worch H. 2006. Influence of modified extracellular matrices on Ti6AL4V implants on binding and release of VEGF. *J. Biomed. Mater. Res. A* 79A: 882–894.
- Xu X, Jha AK, Duncan RL, Jia X. 2011. Heparin-decorated, hyaluronic acid-based hydrogel particles for the controlled release of bone morphogenetic protein 2. *Acta Biomater.* 7: 3050–3059.
- Yadav U, Srivastava SK, Ramana KV. 2012. Prevention of VEGF-induced growth and tube formation in human retinal endothelial cells by aldose reductase inhibition. *J. Diabetes Complications* 26: 369–377.
- Yang J, Wang X, Fuh G, Yu L, Wakshull E, Khosraviani M, Day ES, Demeule B, Liu J, Shire SJ, Ferrara N, Yadav S. 2014. Comparison of binding characteristics and in vitro activities of three inhibitors of vascular endothelial growth factor A. *Mol. Pharm.* 11: 3421–3430.

-
- Yao C, Markowicz M, Pallua N, Magnus Noah E, Steffens G. 2008. The effect of cross-linking of collagen matrices on their angiogenic capability. *Biomaterials* 29: 66–74.
- Yokoyama A, Gelinsky M, Kawasaki T, Kohgo T, König U, Pompe W, Watari F. 2005. Biomimetic porous scaffolds with high elasticity made from mineralized collagen—An animal study. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 75B: 464–472.
- You C, Erol Sandalcioglu I, Dammann P, Felbor U, Sure U, Zhu Y. 2013. Loss of CCM3 impairs DLL4-Notch signalling: implication in endothelial angiogenesis and in inherited cerebral cavernous malformations. *J. Cell. Mol. Med.* 17: 407–418.
- Zhang L, Zhang L, Lan X, Xu M, Mao Z, Lv H, Yao Q, Tang P. 2014. Improvement in angiogenesis and osteogenesis with modified cannulated screws combined with VEGF/PLGA/fibrin glue in femoral neck fractures. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 25: 1165–1172.
- Zhao H, Jin H, Cai J, Ding S. 2010. The process of collagen biomineralization observed by AFM in a model dual membrane diffusion system. *Ultramicroscopy* 110: 1306–1311.
- Zieris A, Chwalek K, Prokoph S, Levental KR, Welzel PB, Freudenberg U, Werner C. 2011. Dual independent delivery of pro-angiogenic growth factors from starPEG-heparin hydrogels. *J. Controlled Release* 156: 28–36.
- Zisch AH, Lutolf MP, Hubbell JA. 2003. Biopolymeric delivery matrices for angiogenic growth factors. *Cardiovasc. Pathol.* 12: 295–310.

Anhang

Im Nachfolgenden sind die gemessenen Werte der im Ergebnisteil gezeigten VEGF-Freisetzungsversuche aus Heparin-freien und Heparin-modifizierten Scaffolds sowie aus Scaffolds mit einem injizierten VEGF-haltigen Depot tabellarisch dargestellt.

Im Anschluss wird anhand von teilweise voneinander abweichenden Ergebnissen von Wiederholungsversuchen auf die Problematik der Unterschiede zwischen den verwendeten Kollagenchargen eingegangen.

In Tabelle 29 sind die gemessenen Werte der täglichen und kumulativen VEGF-Freisetzung aus Heparin-freien und Heparin-modifizierten („insitu“ und „post“) Scaffolds über einen Zeitraum von 7 Tagen dargestellt. Diese Werte beziehen sich auf die Abbildung 30.

Tabelle 29: VEGF-Menge der täglichen und kumulativen Freisetzung aus den unten stehenden Scaffoldvarianten über 7 Tage

	2 h	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
Werte der täglichen VEGF-Freisetzung [ng VEGF/ml]								
0	33,53±9,26	71,10±2,70	37,57±2,63	17,67±1,05	11,68±1,32	8,67±1,28	5,90±0,15	4,18±0,58
I-30	2,96±1,05	12,23±1,59	8,98±2,13	7,61±0,79	8,30±0,37	5,11±0,84	5,57±1,13	5,12±0,99
I-75	2,69±0,88	4,13±0,51	5,91±0,90	6,19±0,52	5,10±1,08	4,90±0,51	3,77±0,83	3,41±0,17
I-150	1,45±0,29	2,46±0,88	4,43±0,36	4,01±0,68	3,59±1,21	2,96±0,47	2,96±0,79	2,57±0,82
P-30	1,32±0,20	5,04±1,23	5,83±1,13	6,81±1,06	5,60±0,41	5,71±0,87	4,70±0,38	5,65±1,44
P-75	1,48±0,48	4,48±1,35	4,15±0,62	4,54±0,84	4,43±0,62	3,87±0,69	3,27±0,52	3,47±0,67
P-150	1,27±0,45	4,58±1,86	4,46±0,77	4,12±0,98	3,55±0,37	3,22±0,44	2,84±0,26	2,81±0,27
Werte der kumulativen VEGF-Freisetzung [ng VEGF/Scaffold]								
0	33,53±9,26	104,62±7,09	142,20±4,68	159,87±4,02	171,55±3,82	180,21±3,82	186,11±3,93	190,29±3,92
I-30	2,91±0,87	15,14±2,34	23,89±3,31	31,47±3,79	39,80±3,81	44,95±4,11	50,52±3,96	55,64±4,69
I-75	2,69±0,88	6,80±1,07	12,71±1,90	18,92±1,79	24,02±2,72	28,92±3,16	32,69±3,90	36,10±3,98
I-150	1,44±0,24	3,95±0,71	8,34±0,92	12,35±1,39	16,11±2,44	19,07±2,75	22,03±3,45	24,60±4,15
P-30	1,30±0,17	6,24±1,00	12,07±2,01	18,88±3,06	24,52±3,35	30,24±4,01	34,97±4,18	40,43±5,23
P-75	1,52±0,40	6,00±1,62	10,15±2,16	14,69±2,98	19,13±3,32	23,00±3,94	26,26±4,39	29,73±4,89
P-150	1,27±0,45	5,85±2,15	10,31±2,81	14,43±3,77	17,98±4,02	21,20±4,45	24,04±4,71	26,77±4,77

Tabelle 30 zeigt die VEGF-Freisetzung aus Heparin-freien und Heparin-modifizierten Scaffolds über einen Zeitraum von 28 Tagen. Angegeben sind die absoluten und die kumulativen Werten, welche sich auf Abbildung 31 beziehen.

Tabelle 30: VEGF-Menge der absoluten und kumulativen Freisetzung aus den unten stehenden Scaffold-varianten zu ausgewählten Zeitpunkten

	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d
Werte der absoluten VEGF-Freisetzung [ng VEGF/ml]						
0	24,24±2,67	7,71±0,64	1,46±0,09	1,05±0,07	0,73±0,10	0,24±0,03
I-30	6,29±1,60	3,16±0,19	3,14±0,35	3,36±0,20	2,27±0,37	1,01±0,12
I-75	0,81±0,90	1,17±1,19	1,84±0,65	2,51±0,20	1,14±0,34	0,56±0,06
I-150	2,45±0,22	3,22±0,16	3,81±0,15	4,15±0,21	2,53±0,15	0,90±0,03
P-30	0,81±0,75	0,88±0,36	2,43±0,90	3,22±0,13	3,67±0,09	1,68±0,10
P-75	0,34±0,04	0,54±0,10	1,27±0,42	1,16±0,01	1,49±0,16	0,93±0,19
P-150	0,81±0,28	0,69±0,13	1,10±0,05	0,94±0,18	1,28±0,09	0,61±0,04
Werte der kumulativen VEGF-Freisetzung [ng VEGF/Scaffold]						
0	29,98±2,82	51,42±2,58	61,60±2,39	70,08±2,72	73,59±2,47	74,66±2,35
I-30	7,29±1,61	15,21±2,43	29,26±3,50	39,07±3,96	48,48±4,49	52,44±5,02
I-75	2,95±1,03	8,67±3,13	25,15±4,90	37,69±4,97	47,56±4,67	51,04±4,62
I-150	1,19±0,27	3,31±0,67	11,13±1,44	22,67±1,71	27,04±1,94	29,09±1,97
P-30	1,23±1,28	2,98±2,20	10,09±4,66	18,65±4,45	29,72±5,04	35,79±4,99
P-75	0,47±0,04	1,35±0,16	5,16±1,11	15,23±2,74	19,94±3,42	23,14±3,85
P-150	1,05±0,31	2,33±0,53	5,83±0,76	12,41±0,59	15,77±0,97	17,68±1,12

Um die Freisetzung aus einem Wirkstoffdepot zu untersuchen, wurde VEGF in Kombination mit verschiedenen Komponenten in das Zentrum der Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen injiziert. Tabelle 31 stellt die gemessenen Werte (absolut und kumulativ) der Freisetzung über 27 Tage aus den VEGF-haltigen Depots in den Scaffolds dar. Diese Werte beziehen sich auf Abbildung 40.

Tabelle 31: VEGF-Menge der absoluten und kumulativen Freisetzung aus Kollagenscaffolds beladen mit einer VEGF-Lösung oder mit einem VEGF-haltigen Hydrogeldepot zu ausgewählten Zeitpunkten. Als Kontrolle wurde VEGF (ohne Depot) injiziert.

	1 d	3 d	7 d	13 d	20 d	27 d
Werte der absoluten VEGF-Freisetzung [ng VEGF/ml]						
Kontrolle	57,17±13,71	23,31±3,16	4,99±0,51	4,62±0,51	2,62±0,34	2,22±0,11
Hep	4,11±1,72	4,42±1,57	4,12±1,52	9,10±2,48	10,96±1,80	9,95±2,43
1%Alg	20,56±7,96	12,63±3,02	6,94±1,70	10,58±1,75	8,66±1,74	7,09±1,92
1%HYA	27,27±4,97	18,31±2,53	7,70±0,78	11,80±1,09	8,39±1,32	5,68±0,56
1%MC	47,48±1,84	39,43±4,39	7,02±1,34	7,53±1,81	5,60±0,89	4,64±0,49
1%Alg+Hep	6,00±0,27	7,51±0,64	5,93±0,23	11,58±0,87	11,48±1,08	11,63±0,93
1%Alg+HYA	42,49±15,23	14,36±1,33	6,64±2,05	8,02±3,91	6,86±3,98	4,50±2,09
1%Alg+MC	33,84±2,86	12,31±1,15	4,66±1,00	3,83±3,33	3,19±0,23	2,91±0,10
Werte der kumulativen VEGF-Freisetzung [ng VEGF/Scaffold]						
Kontrolle	100,67±46,19	169,42±51,61	204,00±56,07	215,90±57,22	222,78±58,82	228,88±59,15
Hep	7,21±2,77	16,72±6,06	32,26±11,71	54,77±18,07	83,50±23,81	110,31±30,11
1%Alg	45,47±17,71	71,15±19,24	98,13±21,29	120,63±24,54	144,00±28,42	160,59±31,24
1%HYA	35,87±7,95	83,51±11,57	123,22±14,98	150,58±17,15	175,44±19,47	192,04±21,07
1%MC	66,91±17,89	164,10±21,38	214,81±20,17	234,42±17,54	251,10±15,96	264,12±15,12
1%Alg+Hep	10,26±0,47	25,20±1,30	49,50±2,82	74,43±4,36	108,44±7,44	140,25±10,34
1%Alg+HYA	66,93±21,79	107,03±27,46	145,86±20,08	167,48±10,12	187,13±2,47	201,27±9,73
1%Alg+MC	55,02±8,32	84,62±16,77	112,52±21,88	127,98±25,44	135,90±14,24	138,49±10,57

Weitere Daten zur VEGF-Freisetzung und Testung der biologischen Aktivität aus Heparin-modifizierten und Heparin-freien Scaffolds

Bei der Auswertung von VEGF-Freisetzungsversuchen aus Heparin-modifizierten und Heparin-freien, als auch von Scaffolds mit einem injizierten VEGF-haltigen Depot, sind Abweichungen der täglichen bzw. absoluten und insgesamt freigesetzten VEGF-Menge aufgetreten. Nach Überprüfung der verwendeten Kollagenchargen wurde deutlich, dass ein Zusammenhang zwischen den Schwankungen in der Freisetzung und der Verwendung verschiedener Kollagenchargen bestand. Bei Scaffolds aus natürlichem Ursprung kann die molekulare Zusammensetzung des Kollagens geringfügig abweichen und somit die Eigenschaften der Scaffolds, z.B. die Bindung eines Wachstumsfaktors, verändern.

Die im Abschnitt 4.1.5 beschriebenen VEGF-Freisetzungsversuche aus Heparin-modifizierten und Heparin-freien Scaffolds wurden mit Scaffolds, hergestellt aus verschiedenen Kollagenansätzen aber aus der gleichen Kollagencharge, durchgeführt. Im Nachfolgenden sind die Ergebnisse der durchgeführten Freisetzungsversuche und Experimente zur Bestimmung der biologischen Aktivität des freigesetzten VEGF unter Verwendung von Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen aus einer anderen Kollagencharge dargestellt.

Abbildung 46 zeigt die VEGF-Freisetzungsergebnisse, bei welchen die Freisetzung aus Heparin-modifizierten Scaffolds („insitu“ und „post“) im Vergleich zur Heparin-freien Variante stark verzögert wurde. Des Weiteren nahm die freigesetzte VEGF-Menge tendenziell mit zunehmender Heparinkonzentration (30, 75 und 150 mg Heparin/g min. Koll.), gebunden an den Scaffolds, ab. Diese Ergebnisse bestätigen die bereits dargestellten Daten der Abbildung 30. Allerdings wurde mehr VEGF (nach 7 Tagen bis zu 95% des eingesetzten VEGF aus der Heparin-freien Variante) als bei dem hier gezeigten Versuch (nur 55% des eingesetzten VEGF) freigesetzt. Die Werte zur täglichen und kumulativen Freisetzung sind in Tabelle 32 dargestellt.

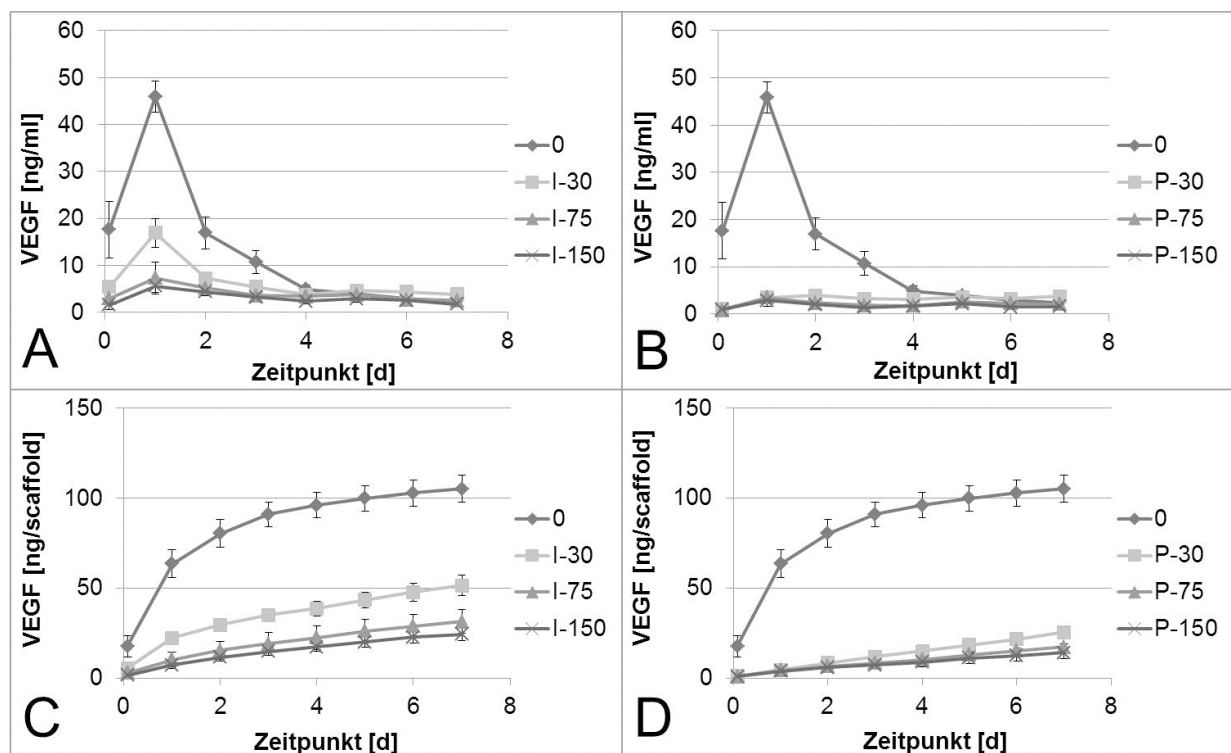
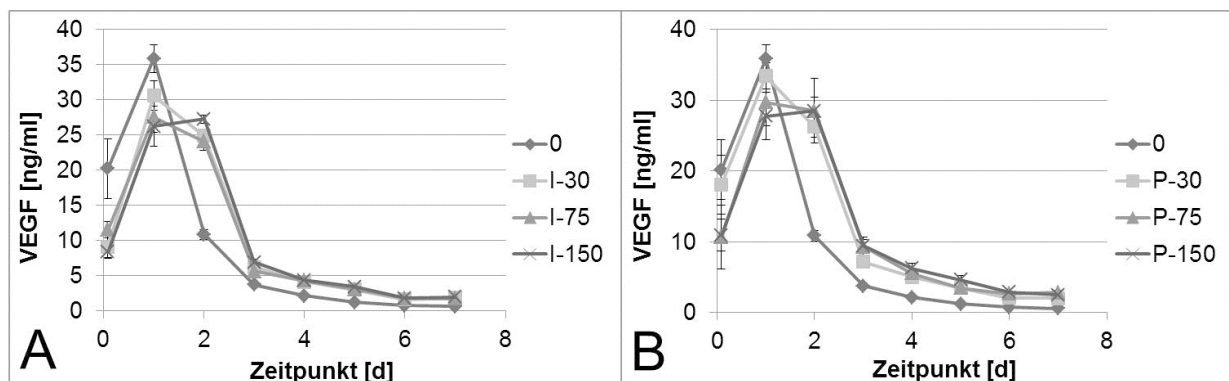


Abbildung 46: VEGF-Freisetzung von Heparin-freien und Heparin-modifizierten Scaffolds über 7 Tage (Wiederholungsversuch 1). Beladung der Scaffolds erfolgte mit 200 ng VEGF über Nacht; ungebundenes VEGF wurde durch Spülen entfernt. Die Freisetzung wurde unter Zellkulturbedingungen in 1 ml Freisetzungsmittel untersucht. Ein Wechsel des Medium wurde zuerst nach 2h, dann alle 24 h durchgeführt und mittels ELISA quantifiziert (n=4, Mittelwert \pm Stabw). Beide Modifizierungen „insitu“ und „post“ hatten einen signifikanten Einfluss auf die Freisetzung; bei der kumulativen Freisetzung bestand zu jedem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zur Heparin-freien Variante (*p < 0,05). A) tägliche Freisetzung bei den „insitu“-modifizierten Varianten, B) tägliche Freisetzung bei den „post“-modifizierten Varianten, C) kumulative Freisetzung bei den „insitu“-modifizierten Varianten und D) kumulative Freisetzung bei den „post“-modifizierten Varianten.

Tabelle 32: VEGF-Menge der täglichen und kumulativen Freisetzung aus den unten stehenden Scaffold-varianten über 7 Tage (Wiederholungsversuch 1)

	2 h	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
Werte der täglichen VEGF-Freisetzung [ng VEGF/ml]								
0	17,62±6,02	45,90±3,29	16,90±3,41	10,71±2,50	4,88±0,98	3,90±0,28	2,94±0,44	2,41±0,45
I-30	5,44±0,23	16,90±3,08	7,25±0,18	5,38±0,07	3,77±1,15	4,62±0,34	4,36±0,72	3,82±0,59
I-75	2,96±1,31	7,30±3,45	5,16±1,65	3,56±1,35	3,43±0,56	3,72±0,39	2,70±0,41	2,55±0,40
I-150	1,59±0,95	5,59±1,34	4,36±0,48	3,26±0,52	2,39±0,56	2,89±0,76	2,56±0,39	1,74±0,45
P-30	1,03±0,41	3,52±1,01	3,95±1,01	3,26±0,91	3,17±0,48	3,58±0,13	3,18±0,26	3,73±0,37
P-75	0,82±0,40	3,50±0,52	2,34±0,69	1,81±0,43	1,77±0,22	2,63±0,45	2,29±0,12	2,07±0,60
P-150	0,95±0,63	2,84±1,15	2,01±0,78	1,36±0,44	1,69±0,17	2,19±0,48	1,45±0,33	1,61±0,25
Werte der kumulativen VEGF-Freisetzung [ng VEGF/Scaffold]								
0	0,95±0,63	3,79±1,62	5,80±2,24	7,17±2,45	8,86±2,57	11,05±3,01	12,50±3,04	14,11±3,26
I-30	0,82±0,40	4,32±0,44	6,66±0,84	8,46±1,16	10,23±1,37	12,86±1,59	15,15±1,60	17,22±1,71
I-75	1,03±0,41	4,55±1,36	8,49±2,35	11,75±3,18	14,92±3,59	18,50±3,62	21,68±3,63	25,41±3,41
I-150	17,62±6,02	63,52±7,71	80,43±7,62	91,14±6,83	96,02±7,08	99,92±7,18	102,86±7,34	105,27±7,60
P-30	1,59±0,95	7,18±2,01	11,54±2,05	14,80±2,05	17,20±2,27	20,08±2,95	22,64±3,01	24,38±3,45
P-75	2,96±1,31	10,27±4,14	15,43±5,05	18,98±6,33	22,41±6,41	26,13±6,64	28,83±6,59	31,39±6,67
P-150	5,44±0,23	22,35±2,85	29,60±3,03	34,97±2,96	38,75±4,11	43,36±4,45	47,73±5,17	51,55±5,76

In Abbildung 47 ist ein weiterer VEGF-Freisetzungsversuch aus Heparin-modifizierten und Heparin-freien Scaffolds dargestellt. Entgegen den in Abbildung 30 und Abbildung 46 dargestellten Versuchen verzögerte die Heparin-Modifizierung nicht die Freisetzung des VEGF. Die Werte zur täglichen und kumulativen Freisetzung sind in Tabelle 33 dargestellt.



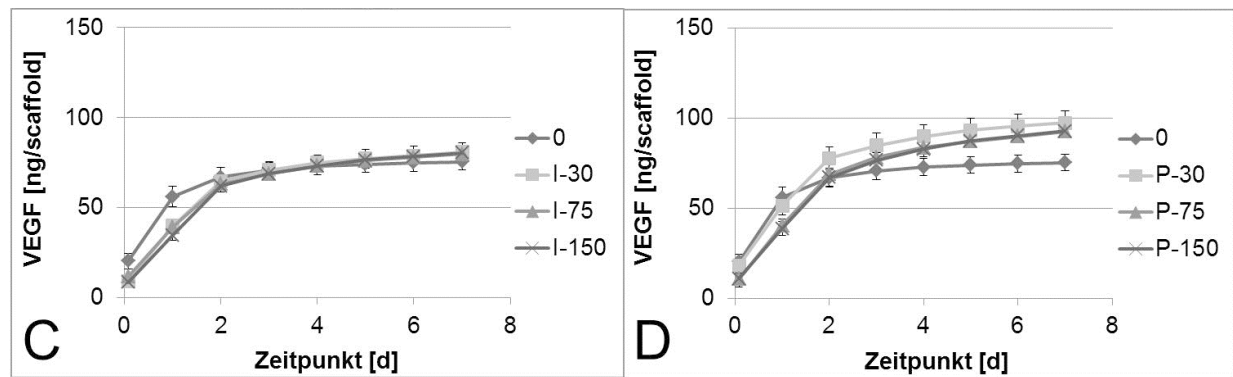


Abbildung 47: VEGF-Freisetzung von Heparin-freien und Heparin-modifizierten Scaffolds über 7 Tage (Wiederholungsversuch 2). Beladung der Scaffolds erfolgte mit 200 ng VEGF über Nacht; ungebundenes VEGF wurde durch Spülen entfernt. Die Freisetzung wurde unter Zellkulturbedingungen in 1 ml Freisetzungsmittel untersucht. Ein Wechsel des Medium wurde zuerst nach 2h, dann alle 24 h durchgeführt und mittels ELISA quantifiziert ($n=4$, Mittelwert \pm Stabw). Beide Modifizierungen „insitu“ und „post“ hatten tendenziell keinen signifikanten Einfluss auf die Freisetzung ($*p < 0,05$). A) tägliche Freisetzung bei den „insitu“-modifizierten Varianten, B) tägliche Freisetzung bei den „post“-modifizierten Varianten, C) kumulative Freisetzung bei den „insitu“-modifizierten Varianten und D) kumulative Freisetzung bei den „post“-modifizierten Varianten.

Tabelle 33: VEGF-Menge der täglichen und kumulativen Freisetzung aus den unten stehenden Scaffoldvarianten über 7 Tage (Wiederholungsversuch 2)

	2 h	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
Werte der täglichen VEGF-Freisetzung [ng VEGF/ml]								
0	10,91 \pm 2,26	27,78 \pm 3,37	28,50 \pm 1,96	9,43 \pm 0,93	6,26 \pm 0,70	4,65 \pm 0,56	2,87 \pm 0,16	2,47 \pm 0,14
I-30	10,64 \pm 4,53	29,75 \pm 3,32	28,53 \pm 4,58	9,31 \pm 1,35	5,53 \pm 0,31	3,46 \pm 0,11	2,65 \pm 0,20	2,81 \pm 0,35
I-75	18,09 \pm 4,16	33,42 \pm 1,84	26,27 \pm 1,51	7,18 \pm 0,33	5,04 \pm 0,42	3,45 \pm 0,33	2,08 \pm 0,25	2,02 \pm 0,30
I-150	20,21 \pm 4,23	35,88 \pm 2,00	10,86 \pm 0,71	3,74 \pm 0,27	2,17 \pm 0,17	1,24 \pm 0,08	0,73 \pm 0,04	0,61 \pm 0,04
P-30	8,35 \pm 0,72	26,25 \pm 2,88	27,25 \pm 0,55	6,91 \pm 0,49	4,34 \pm 0,24	3,40 \pm 0,27	1,77 \pm 0,15	2,00 \pm 0,14
P-75	11,53 \pm 1,18	27,55 \pm 2,12	24,07 \pm 1,22	5,66 \pm 0,09	4,27 \pm 0,19	3,07 \pm 0,24	1,80 \pm 0,12	1,75 \pm 0,20
P-150	9,13 \pm 1,67	30,61 \pm 2,13	24,87 \pm 0,89	6,23 \pm 0,60	4,13 \pm 0,12	3,03 \pm 0,26	1,60 \pm 0,23	1,88 \pm 0,05

Werte der kumulativen VEGF-Freisetzung [ng VEGF/Scaffold]								
0	10,91±2,26	38,69±3,85	67,19±5,04	76,62±4,53	82,87±4,05	87,52±3,76	90,39±3,77	92,86±3,69
I-30	10,64±4,53	40,39±3,75	68,92±2,24	78,22±2,96	83,75±3,19	87,21±3,25	89,86±3,41	92,67±3,66
I-75	18,09±4,16	51,51±5,14	77,78±6,39	84,96±6,69	90,00±6,66	93,45±6,70	95,52±6,74	97,55±6,75
I-150	20,21±4,23	56,09±5,91	66,95±5,22	70,69±4,97	72,86±4,82	74,10±4,74	74,83±4,72	75,44±4,71
P-30	8,35±0,72	34,60±2,93	61,86±3,37	68,77±3,30	73,11±3,25	76,51±3,37	78,29±3,29	80,29±3,30
P-75	11,5±1,18	39,09±2,98	63,15±3,14	68,81±3,12	73,09±3,25	76,15±3,14	77,95±3,02	79,70±2,90
P-150	9,13±1,67	39,74±3,79	64,61±3,79	70,84±4,17	74,97±4,06	77,24±5,29	78,84±5,07	80,72±5,09

Neben der quantitativen Bestimmung der freigesetzten VEGF-Menge aus den Scaffolds wurde die biologische Aktivität des freigesetzten VEGF anhand des proliferationsstimulierenden Effektes auf HDMEC getestet. Wie auch in den dargestellten Ergebnissen des Abschnittes 4.1.5 (Abbildung 33) war in Abbildung 48 der proliferationsstimulierende Effekt des freigesetzten VEGF zu jedem untersuchten Zeitpunkt ersichtlich.

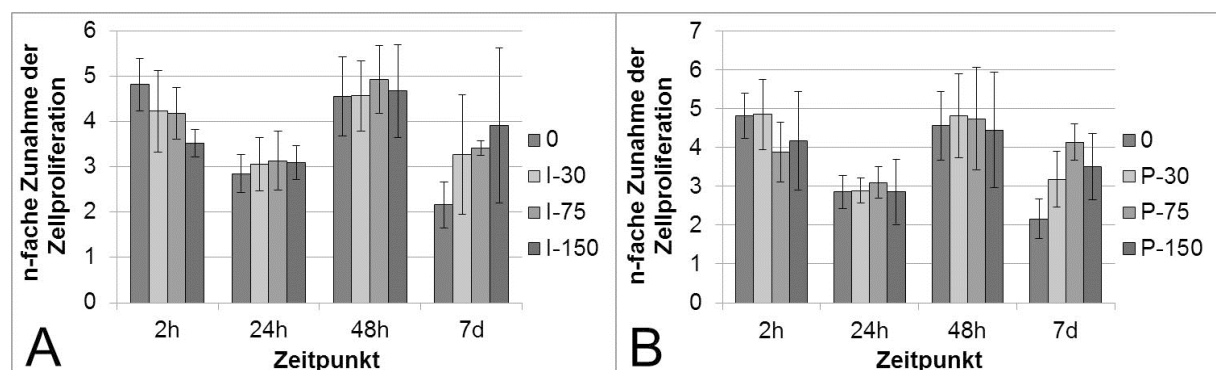


Abbildung 48: Biologische Aktivität des von Scaffolds freigesetzten VEGF zu den Zeitpunkten 2 h, 24 h, 48 h und 7 d (entspricht (Wiederholungsversuch 1). Angegeben wird die n-fache Zunahme der Zellzahl im Vergleich zu VEGF-freien Kontrollen. Die Zunahme der Zellzahl, gemessen anhand der DNA der Zellen nach der Inkubationszeit, wurde von den Kontrollen (Medium der Scaffolds ohne VEGF) auf den Wert 1 gesetzt und mit der Zunahme der Zellzahl, welche mit freigesetztem Medium von den Scaffolds mit VEGF inkubiert wurden, ins Verhältnis gesetzt. Ein Wert über 1 zeigt somit die Zunahme der Zellzahl aufgrund der biologischen Aktivität des freigesetzten VEGF an (n=4, Mittelwert ± Stabw, *p < 0,05). A) „insitu“-modifizierte und B) „post“-modifizierte Scaffolds

Abbildung 49 zeigt einen weiteren Versuch, bei dem die biologische Aktivität des freigesetzten VEGF aus Heparin-modifizierten und Heparin-freien Scaffolds getestet wurde.

Im Gegensatz zu den dargestellten Ergebnissen in Abbildung 33 war hier der proliferationsstimulierende Effekt des freigesetzten VEGF tendenziell geringer und es waren keine großen

Unterschiede in der Zunahme der Zellzahl mit freigesetztem VEGF aus modifizierten im Vergleich zu Heparin-freien Scaffolds zu erkennen.

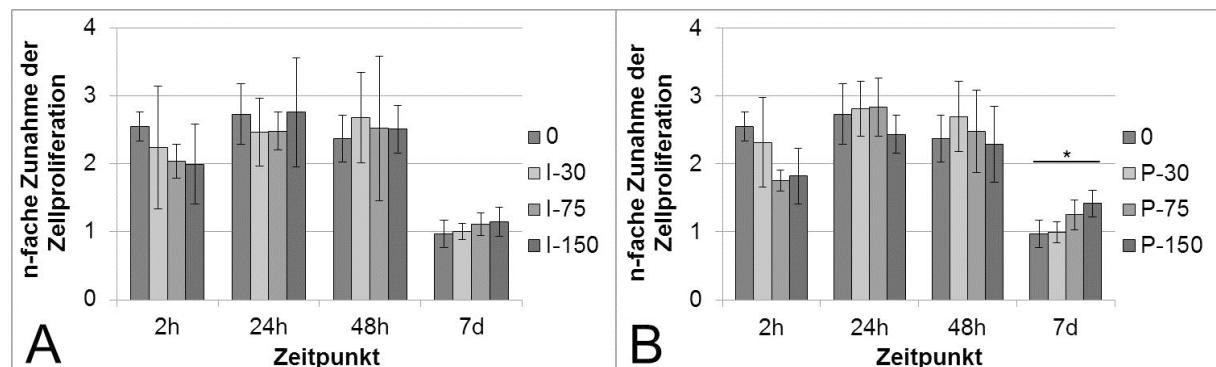


Abbildung 49: Biologische Aktivität des von Scaffolds freigesetzten VEGF zu den Zeitpunkten 2 h, 24 h, 48 h und 7 d (entspricht Wiederholungsversuch 2). Angegeben wird die n-fache Zunahme der Zellzahl im Vergleich zu VEGF-freien Kontrollen. Die Zunahme der Zellzahl, gemessen anhand der DNA der Zellen nach der Inkubationszeit, wurde von den Kontrollen (Medium der Scaffolds ohne VEGF) auf den Wert 1 gesetzt und mit der Zunahme der Zellzahl, welche mit freigesetztem Medium von den Scaffolds mit VEGF inkubiert wurden, ins Verhältnis gesetzt. Ein Wert über 1 zeigt somit die Zunahme der Zellzahl aufgrund der biologischen Aktivität des freigesetzten VEGF an (n=4, Mittelwert \pm Stabw, *p < 0,05). A) „insitu“-modifizierte und B) „post“-modifizierte Scaffolds

Weitere Daten zur Freisetzung aus injizierten VEGF-haltigen Depots in Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen

Die Wiederholungsversuche zur VEGF-Freisetzung aus Scaffolds mit einem injizierten Wirkstoffdepot sind in Abbildung 50 und Abbildung 51 dargestellt. Die verwendeten Scaffolds wurden aus der gleichen Kollagencharge aber unterschiedlichen Kollagenansätzen hergestellt.

In Abbildung 50 wird ersichtlich, ähnlich den Ergebnissen im Abschnitt 4.2.3 mit der Abbildung 40, dass die VEGF-Freisetzung aus dem Wirkstoffdepot durch die Verwendung von verschiedenen Komponenten unterschiedlich stark verzögert wurde. Im Vergleich zu den Ergebnissen aus Abbildung 40 war hier die freigesetzte VEGF-Menge aus allen Varianten tendenziell geringer und die Varianten Alg und HYA zeigten eine andere, stark verzögerte Freisetzungskinetik. Für die Variante Alg+HYA konnten in diesem Versuch keine Werte aufgrund der schwierigen Injizierbarkeit der sehr viskosen Kombination gemessen werden. Die dazugehörigen Werte zur absoluten und kumulativen Freisetzung sind in Tabelle 34 dargestellt.

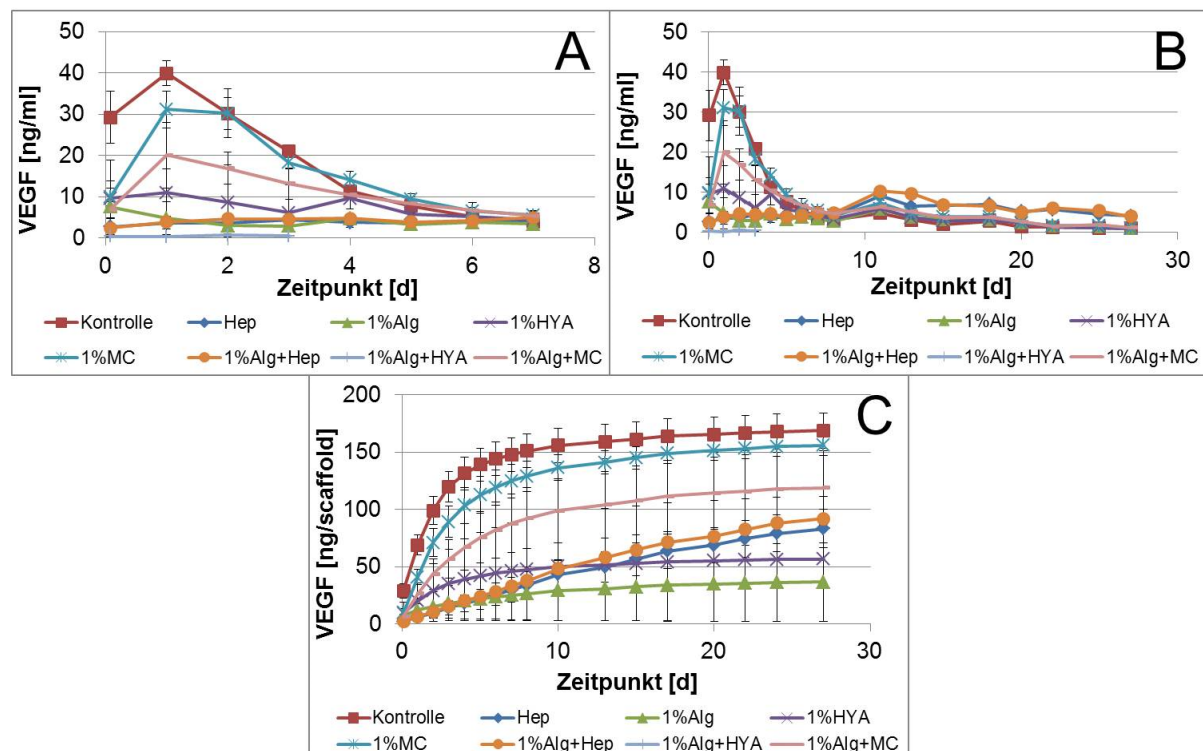


Abbildung 50: VEGF-Freisetzung aus Scaffolds beladen mit einem VEGF-haltigen Depot. Beladung der Scaffolds erfolgte mit 400 ng VEGF, welche zusammen mit einer Lösung bzw. Hydrogelkomponenten injiziert wurden (Wiederholungsversuch 1). Die VEGF-Freisetzung wurde unter Zellkulturbedingungen in 1,5 ml Freisetzungsmedium untersucht und der Gehalt von VEGF mittels ELISA quantifiziert ($n=3$, Mittelwert \pm Stabw). Varianten mit einem Depot bzw. Hydrogeldepot hatten einen signifikanten Einfluss auf die absolute und kumulative Freisetzung (* $p < 0,05$). A) tägliche Freisetzung innerhalb von 7 Tagen, B) absolute Freisetzung über 27 Tage, C) kumulative Freisetzung über 27 Tage

Tabelle 34: VEGF-Menge der absoluten und kumulativen Freisetzung aus Kollagenscaffolds beladen mit einer VEGF-Lsg oder mit einem Hydrogeldepot zu ausgewählten Zeitpunkten (Wiederholungsversuch 1)

	1 d	3 d	7 d	13 d	20 d	27 d
Werte der absoluten VEGF-Freisetzung [ng VEGF/ml]						
Kontrolle	39,92 \pm 3,09	20,90 \pm 1,05	3,82 \pm 0,18	3,11 \pm 0,23	1,46 \pm 0,14	0,98 \pm 0,06
Hep	3,65 \pm 1,54	4,49 \pm 1,57	4,08 \pm 0,94	6,55 \pm 0,68	5,22 \pm 0,51	4,08 \pm 0,61
1%Alg	4,77 \pm 3,98	2,91 \pm 2,59	3,37 \pm 0,00	3,83 \pm 0,00	2,45 \pm 0,00	1,03 \pm 0,00
1%HYA	10,92 \pm 5,75	6,13 \pm 6,77	4,44 \pm 0,00	3,76 \pm 0,00	2,28 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00
1%MC	31,11 \pm 4,53	18,21 \pm 1,52	5,50 \pm 1,03	4,70 \pm 1,83	2,47 \pm 0,58	1,09 \pm 0,11
1%Alg+Hep	3,90 \pm 0,33	4,54 \pm 0,18	4,92 \pm 0,35	9,68 \pm 0,67	5,04 \pm 0,12	4,06 \pm 0,42
1%Alg+HYA	/	/	/	/	/	/
1%Alg+MC	20,02 \pm 7,94	13,15 \pm 3,75	5,34 \pm 1,13	5,25 \pm 1,12	2,72 \pm 0,56	1,22 \pm 0,26

Werte der kumulativen VEGF-Freisetzung [ng VEGF/Scaffold]						
Kontrolle	69,11±8,80	120,15±13,29	148,13±14,62	159,32±15,09	165,59±15,35	169,07±15,43
Hep	6,39±3,34	14,46±6,19	30,00±10,61	49,94±13,44	68,93±15,42	83,23±16,80
1%Alg	12,36±10,10	18,22±15,38	25,46±22,24	31,05±28,05	35,10±32,40	36,93±34,34
1%HYA	20,51±14,39	35,29±30,16	46,34±42,31	51,89±48,82	55,34±53,01	56,89±54,82
1%MC	41,02±6,60	89,44±13,74	124,90±14,55	141,22±10,31	151,54±8,76	156,08±8,58
1%Alg+Hep	6,35±1,38	15,51±1,38	33,23±0,89	58,03±0,94	76,64±0,77	92,26±1,19
1%Alg+HYA	/	/	/	/	/	/
1%Alg+MC	26,87±9,31	56,92±16,96	87,76±25,55	104,18±29,20	114,44±31,50	119,10±32,29

Auch im wiederholten Freisetzungsversuch wurde das injizierte VEGF durch die verschiedenen Depotkomponenten verzögert freigesetzt (siehe Abbildung 51). Allerdings wurde bei der Kontrollvariante im Vergleich zum dargestellten Versuch in Abbildung 40 nur 25% der eingesetzten VEGF-Menge freigesetzt. Auch die Varianten Alg+HYA und Alg+MC wiesen eine stark verzögerte Freisetzung auf, wobei diese Varianten durch ihre hohe Viskosität schwierig zu injizieren waren und vermutlich deshalb Schwankungen in der Freisetzung zwischen den einzeln durchgeführten Versuchen auftraten. Die dazugehörigen Werte zur absoluten und kumulativen Freisetzung sind in Tabelle 35 dargestellt.

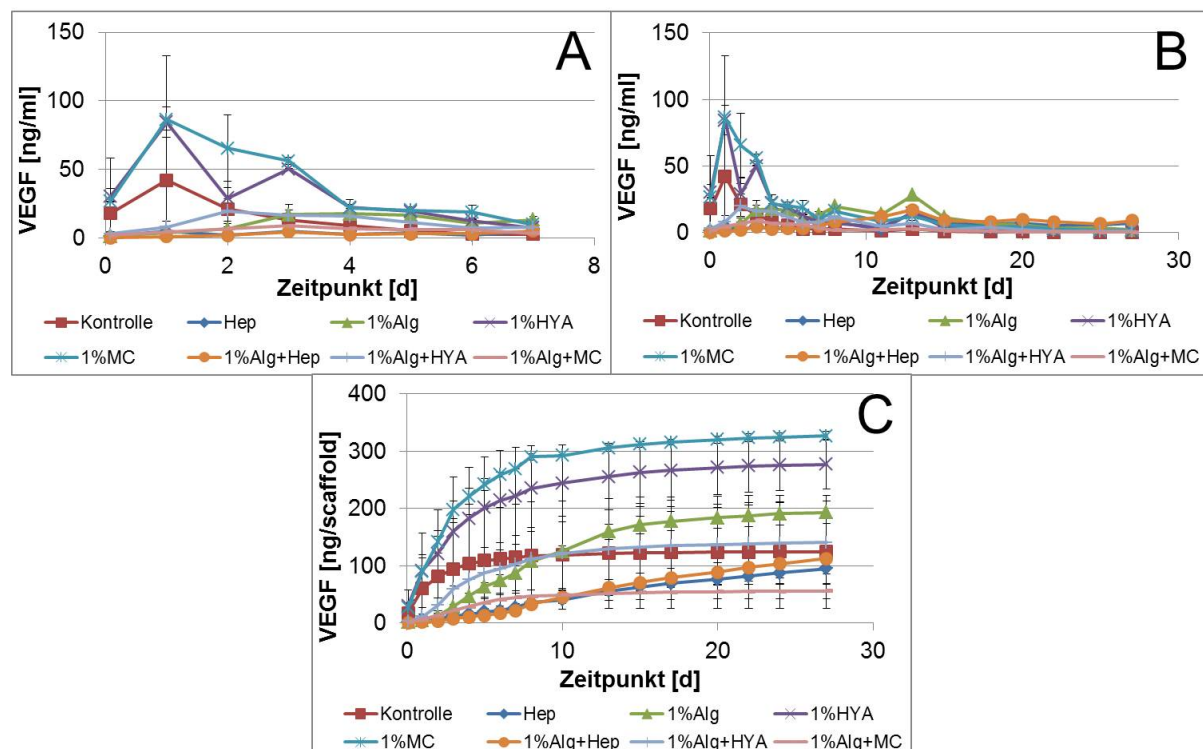


Abbildung 51: VEGF-Freisetzung aus Scaffolds beladen mit einem VEGF-haltigen Depot. Beladung der Scaffolds erfolgte mit 400 ng VEGF, welche zusammen mit einer Lösung bzw. Hydrogelkomponenten injiziert wurden (Wiederholungsversuch 2). Die Freisetzung wurde unter Zellkulturbedingungen in 1,5 ml Freisetzungsmedium untersucht und der Gehalt an VEGF mittels ELISA quantifiziert (n=3, Mittelwert ± Stabw). Varianten mit einem Depot bzw. Hydrogeldepot hatten einen signifikanten Einfluss auf die

absolute und kumulative Freisetzung (*p < 0,05). A) tägliche Freisetzung innerhalb von 7 Tagen, B) absolute Freisetzung über 27 Tage, C) kumulative Freisetzung über 27 Tage

Tabelle 35: VEGF-Menge der absoluten und kumulativen Freisetzung aus Kollagenscaffolds beladen mit einer VEGF-Lsg oder mit einem Hydrogeldepot zu ausgewählten Zeitpunkten (Wiederholungsversuch 2)

	1 d	3 d	7 d	13 d	20 d	27 d
Werte der absoluten VEGF-Freisetzung [ng VEGF/ml]						
Kontrolle	42,28±36,22	13,29±11,14	2,93±2,29	2,65±2,11	0,56±0,44	0,38±0,29
Hep	4,87±0,71	4,73±0,35	5,18±0,73	15,48±1,01	7,20±0,93	7,36±0,28
1%Alg	3,92±0,70	17,01±3,45	13,22±2,52	28,22±3,31	6,08±1,51	2,22±0,24
1%HYA	84,44±11,21	50,25±0,53	7,49±1,93	14,65±6,90	2,32±0,38	1,10±0,27
1%MC	86,56±46,08	56,28±2,48	9,86±2,28	12,27±2,83	4,55±0,86	1,83±0,20
1%Alg+Hep	1,15±0,39	4,61±1,19	5,06±0,59	17,09±2,82	9,86±0,90	8,94±0,46
1%Alg+HYA	8,19±4,35	16,39±1,39	7,80±5,25	7,15±5,15	2,19±1,89	1,02±0,78
1%Alg+MC	4,45±4,39	8,94±3,91	3,48±1,42	2,76±0,93	0,75±0,24	0,40±0,14
Werte der kumulativen VEGF-Freisetzung [ng VEGF/Scaffold]						
Kontrolle	60,35±54,06	94,81±81,01	115,00±92,16	121,72±96,20	123,88±97,85	125,00±98,70
Hep	6,38±0,75	13,17±1,39	27,39±2,73	56,27±6,68	76,63±8,41	95,36±9,41
1%Alg	5,35±0,83	29,08±3,95	87,86±12,20	159,92±13,33	184,13±17,94	193,36±19,90
1%HYA	91,88±65,22	160,09±94,54	221,99±85,00	255,82±58,61	271,64±47,83	277,51±43,70
1%MC	89,59±30,61	198,06±15,52	269,30±0,55	305,65±5,77	320,63±6,24	326,87±7,38
1%Alg+Hep	1,40±0,42	7,97±1,98	22,03±4,04	62,03±14,16	89,01±16,56	112,92±17,94
1%Alg+HYA	11,33±4,56	59,97±33,76	102,76±50,53	129,43±68,76	137,58±70,60	140,66±72,78
1%Alg+MC	6,40±3,27	22,28±10,92	45,04±11,36	51,76±11,79	54,77±12,82	56,04±13,06

Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Michael Gelinsky für die Bereitstellung des sehr interessanten und anspruchsvollen Themas und die Möglichkeit der Ausführung der Arbeit am *Zentrum für Translationale Knochen-, Gelenk- und Weichgewebeforschung*. Er half mir stets mit Anregungen, Ratschlägen und Diskussionen weiter. Durch die Einbindung des Projektes in den überregionalen SFB/Transregio 79 bekam ich die Möglichkeit, in einem interdisziplinären Feld zu arbeiten, Erfahrungen mit vielen Doktoranden und Wissenschaftlern auszutauschen und an gemeinsamen Veranstaltungen und Kongressen teilzunehmen, was mir sehr in meinem wissenschaftlichen Werdegang geholfen hat.

Des Weiteren möchte ich meinen Mitstreitern im SFB/Transregio 79 und meinen Projektpartnern Frau Assia Gabrielyan und Frau Prof. Dr. Angela Rösen-Wolff danken.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Anja Lode für ihre stets hilfsbereite Art, ihre Ratschläge, Empfehlungen und die Weitergabe eigener Erfahrungen und nicht zuletzt für die gesamte hervorragende Betreuung während meiner Doktorandenzeit.

Frau Ortrud Zieschang möchte ich für ihre Unterstützung bei der Herstellung der vielen Scaffoldkörper danken und der gemeinsamen schönen Zeit im Labor.

Im Rahmen des Projektes war ich an der Betreuung von Frau Mandy Quade beteiligt, welches mir aufgrund ihrer schnellen Auffassungsgabe, der Selbstständigkeit bei der Durchführung und Planung von Versuchen und ihrem sonnigen Gemüt eine besondere Freude war,.

Herrn Ashwini Rahul Akkineni danke ich besonders für die Ratschläge und große Unterstützung bei der Anfertigung und Auswertung von Kryoschnitten. Nach einer langen Prozedur brachte er mich darauf, dass es auch einfacher gehen kann.

Besonders danken möchte ich auch Frau Dr. Birgit Paul, für die gemeinsame Zeit und die Unterstützung bei der Durchführung der Druckversuche, sowie Herrn Dr. Armin Springer für die guten Tipps, Ratschläge und Hilfe im Bereich der Rasterelektronenmikroskopie.

Ein großer und herzlicher Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe, mit der ich eine wunderbare Zeit verbringen durfte und welche stets ein offenes Ohr für Anregungen und Probleme aber auch Privates hatten. Ich kann zu Recht sagen, dass mir diese lieben und netten Menschen fehlen werden. Zuletzt möchte ich meiner Familie danken. Sie stand immer hinter mir, unterstützte mich in allen Lebenslagen und ihr Stolz erfüllt mich mit Freude.

Eidesstattliche Erklärung

1. Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.
2. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Die Entwicklung der Verfahren zur Modifizierung des mineralisierten Kollagens mit Heparin gemäß den Methoden "insitu" und "post" beruht auf Vorarbeiten, die Frau Dr. Ulla König, damals wiss. Mitarbeiterin in der AG des Betreuers Prof. Gelinsky, durchgeführt hat. Dies ist auch durch eine gemeinsame Publikation dokumentiert (König U, Lode A, Welzel PB, Ueda Y, Knaack S, Henß A, Hauswald A, Gelinsky M. 2014: Heparinization of a biomimetic bone matrix: integration of heparin during matrix synthesis versus adsorptive post surface modification. J. Mater. Sci. Mater. Med. 25: 607–621.).

Weitere, kleinere Unterstützungsleistungen sind ausserdem in der Danksagung aufgeführt.

3. Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.
4. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.
5. Die Inhalte dieser Dissertation wurden in folgender Form veröffentlicht:

Siehe Publikationsverzeichnis

6. Ich bestätige, dass es keine zurückliegenden erfolglosen Promotionsverfahren gab.
7. Ich bestätige, dass ich die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden anerkenne.
8. Ich habe die Zitierrichtlinien für Dissertationen an der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden zur Kenntnis genommen und befolgt.

Dresden, den

Unterschrift des Doktoranden

Einhaltung der aktuellen gesetzlichen Vorgaben im Rahmen meiner Dissertation

Hiermit bestätige ich die Einhaltung der folgenden aktuellen gesetzlichen Vorgaben im Rahmen meiner Dissertation

☐ das zustimmende Votum der Ethikkommission bei Klinischen Studien, epidemiologischen Untersuchungen mit Personenbezug oder Sachverhalten, die das Medizinproduktegesetz betreffen

Aktenzeichen der zuständigen Ethikkommission EK261092009

☐ die Einhaltung der Bestimmungen des Tierschutzgesetzes

Aktenzeichen der Genehmigungsbehörde zum Vorhaben/zur Mitwirkung

☐ die Einhaltung des Gentechnikgesetzes

Projektnummer 55-8811.71/135

☐ die Einhaltung von Datenschutzbestimmungen der Medizinischen Fakultät und des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus.

Dresden, den

Unterschrift des Doktoranden

Publikationsverzeichnis

Knaack S, Lode A, Hoyer B, Rösen-Wolff A, Gabrielyan A, Roeder I, Gelinsky M. 2014. Heparin modification of a biomimetic bone matrix for controlled release of VEGF. J Biomed Mater Res A 102: 3500–3511.

Gabrielyan A, Knaack S, Gelinsky M, Arnhold S, Rösen-Wolff A. 2014. Hypoxia-conditioned media allows species-specific attraction of bone marrow stromal cells without need for recombinant proteins. BMC Vet. Res. 10: 56.

König U, Lode A, Welzel PB, Ueda Y, Knaack S, Henß A, Hauswald A, Gelinsky M. 2014. Heparinization of a biomimetic bone matrix: integration of heparin during matrix synthesis versus adsorptive post surface modification. J Mater Sci Mater Med 25: 607–621.

Henss A, Rohnke M, Knaack S, Kleine-Boymann M, Leichtweiss T, Schmitz P, El Khassawna T, Gelinsky M, Heiss C, Janek J. 2013. Quantification of calcium content in bone by using ToF-SIMS-a first approach. Biointerphases 8: 31.

Lode A, Krujatz F, Brüggemeier S, Quade M, Schütz K, Knaack S, Weber J, Bley T, Gelinsky M. 2015. Green bioprinting: Fabrication of photosynthetic algae-laden hydrogel scaffolds for biotechnological and medical applications. Eng Life Sci (noch nicht gedruckt, doi: 10.1002/elsc.201400205).

Veröffentlichte Kongressbeiträge

Knaack S, Gabrielyan A, Rösen-Wolff A, Gelinsky M. 2012. Ein neues Konzept für die Knochendefektheilung: Funktionalisierte Biomaterialien zur gerichteten Zellmigration. Orthopädische Nachrichten 10, 21.